

· 研究报告 ·

濒危植物大别山五针松根际细菌群落特征与功能分析

石水琴^{1†}, 秦华光^{1†}, 张静静¹, 韩钰¹, 余湜¹, 彭怡宁², 杨邵¹
汪嘉怡¹, 何光宇¹, 岂泽华¹, 吴文杰², 朱星雨¹, 饶玉春^{2*}, 穆丹^{1*}

¹安庆师范大学生命科学学院, 皖西南生物多样性研究与生态保护安徽省重点实验室, 安庆 246133

²浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004

摘要 植物根际微生物群落对植物健康生长有重要影响, 每种植物根际都有其特定的微生物群落。大别山五针松(*Pinus dabeshanensis*)被国际自然保护联盟列为濒危物种, 具有重要研究价值。该研究采用16S rRNA高通量测序技术与生物信息学方法, 对濒危植物大别山五针松根际细菌群落特征与功能进行分析。结果表明, 大别山五针松根际微生物的主要种类为变形菌门、放线菌门、酸杆菌门和疣微菌门。网络分析表明, 大别山五针松根际细菌类群存在显著相关性, 其中*Bryobacter*属、*Bradyrhizobium*属和未定义的TK10属是互作网络中的重要节点。PICRUST1功能预测表明其微生物组功能主要为氨基酸运输和代谢、细胞壁/膜/膜生物发生以及能量产生和转换。FAPROTAX功能预测表明, 大别山五针松根际富含的优势菌群具有丰富的化学异养、纤维素水解、需氧化学异养和固氮功能, 其对植物生长发育具有重要作用。研究结果可为培育健康的大别山五针松根际微生物菌群及微生物资源的开发利用提供重要依据。

关键词 濒危物种, 大别山五针松, 根际细菌, 高通量测序, 菌群特征

石水琴, 秦华光, 张静静, 韩钰, 余湜, 彭怡宁, 杨邵, 汪嘉怡, 何光宇, 岂泽华, 吴文杰, 朱星雨, 饶玉春, 穆丹 (2022). 濒危植物大别山五针松根际细菌群落特征与功能分析. 植物学报 57, 457–467.

大别山五针松(*Pinus dabeshanensis*)是大别山南端(中国安徽省)特有的濒危植物。在过去1个世纪里, 大别山五针松的种群数量急剧减少, 目前野生个体仅见于安徽金寨和岳西及湖北英山县。由于该物种处于濒临灭绝的危险状态, 1978年, 大别山五针松被国际自然保护联盟列为濒危物种(Lucas and Synge, 1978); 1992年被中国红皮书列为国家二级珍稀濒危保护植物(Fu and Chin, 1992)。自1960年以来进行了几次恢复行动, 但该物种的自然种群仍处于不断减少的状况。

复杂的植物相关微生物群落, 也称为植物的第二基因组, 对植物的健康生长至关重要(Berendsen et al., 2012)。植物-微生物相互作用研究表明, 植物能够

塑造其根际微生物群落, 而根际微生物群落也影响植物的健康生长(Reinhold-Hurek et al., 2015)。植物根部分泌的代谢物促进其根际微生物的生长和活动(Zhu et al., 2017, 2018)。反之, 根际微生物通过提供营养和促进生长的激素、抑制植物病原体和增强对环境胁迫(如干旱、盐、热和霜冻)的耐受性而使植物受益(Nihorimbere et al., 2011)。在籼稻(*Oryza sativa* subsp. *indica*)根际处富集大量参与氮代谢的微生物群体, 且在籼稻的种植过程中接种籼稻根际特异富集的微生物菌群, 可提高籼稻对有机氮的利用, 促进其生长(王孝林和王二涛, 2019)。玉米(*Zea mays*)根际菌群的类芽孢杆菌与植物的干重、固氮酶活性、固氮率、溶解磷显著相关, 固氮类芽孢杆菌(*Paenibacillus*

收稿日期: 2022-03-07; 接受日期: 2022-05-30

基金项目: 安徽省自然科学基金(No.2108085QC138)、安徽省重点研究与开发计划(No.202104f06020024)、国家自然科学基金(No.31800316)、安徽省重点实验室开放基金(No.Wy2021001, No.Wz2021002, No.Wsz202204, No.Wsz202207, No.Wy202206)、安徽高校自然科学研究项目(No.KJ2021A0647)、国家级创新创业项目(No.202110732044X)、安徽省大学生创新创业训练计划(No.S202110372104X, No.S202110372107)、2021年度安庆师范大学研究生线上课程项目(No.2021aqnuxskc02)和研究生教育教学改革项目(No.2021aqnujyxm64)、“敬敷育英”创新创业引领计划和安庆师范大学教研项目(No.2019aqnujyzc127)

† 共同第一作者

* 通讯作者。E-mail: ryc@zjnu.cn; mudansmile@126.com

triticisoli) BJ-18驱动玉米根际细菌、固氮菌和真菌群落的变化(Li et al., 2021)。微生物、植物和土壤之间存在复杂的相互作用。植物根际是微生物与植物相互作用的特定区域,直接受根系分泌物和碎屑的影响。根际土壤微生物,尤其是促进植物生长的根际细菌,在植物生长和逆境响应中发挥重要作用(Sarkar et al., 2018; Tiepo et al., 2018)。植物在生长过程中主动向根际释放多种生物活性物质、糖类和氨基酸,吸引大量微生物在根际定殖,影响根际微生物多样性和群落结构,体现微生物对寄主的特异性。相同实验条件下,与栽培稻相比,野生稻(*O. rufipogon*)中甲烷的产生与利用、关键酶基因丰度和菌群相对丰度都更高,表明野生稻的根际微生物组在甲烷代谢功能方面保持更好的生态平衡(Tian et al., 2022)。在植物生长阶段(Fierer, 2017; Keswani et al., 2019),生长促进菌(*Bacillus*)、生物降解菌(*Bryobacter*、*Arthrobacter*、*Candidatus*、*Solibacter*、*Tumebacillus*和*Acidothermus*)和固氮菌(*Rhizobium*和*Bradyrhizobium*)在整个系统中发挥重要作用(Jacoby et al., 2020)。土壤来源的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)能产生吡咯啉,促进铁吸收及抑制植物病原体尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的生长,从而间接促进植物的生长(Noman et al., 2021; Trivedi et al., 2021)。芽孢杆菌属可以通过在黄瓜(*Cucumis sativus*)根上定殖或形成生物被膜来促进其对铁的吸收(Xu et al., 2018)。显然,根际微生物的生理活动深刻影响植物的生存、生长和发育(Qu et al., 2020),在植物根际定殖的微生物为其宿主提供了许多有益的功能(Bano et al., 2021)。尽管越来越多的研究表明根际微生物群落具有强大功能(Babalola et al., 2021),但对大别山五针松根际微生物群落影响的具体机制仍属未知。此外,人们对根际微生物组的各种有益功能知之甚少。目前,有关大别山五针松的研究主要集中在群落种群、物种分布、遗传多样性和结构等方面,尚未见大别山五针松根际微生物菌群特征的相关研究报道。16S rDNA扩增子测序技术是目前对细菌进行类别鉴定的热门方法,包括菌群物种的组成、多样性及进化关系等。该技术主要用于检测已知或未知环境样本中的微生物基因组,且具有成本低、快速和准确等优点。宋健等(2020)采用16S rDNA测序技术对韭菜(*Allium tuberosum*)根际微生物多样性进行了分析。王亚茹等(2021)采用该方法分析了饵

料不同蛋白水平下的德国小蠊肠道细菌的变化。目前16S rDNA测序技术也是用于动植物菌群检测的热门方法之一。

综上,本研究从大别山五针松根际微生物利用与资源开发的角度,采用16S rRNA高通量测序方法对大别山五针松根际微生物群落进行特征分析和功能预测,旨在阐明大别山五针松根际微生物群落特征,为揭示大别山五针松-微生物相互作用机制奠定基础,同时也为大别山五针松根际微生物资源开发与利用提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究所用大别山五针松(*Pinus dabeshanensis* W. C. Cheng & Y. W. Law)样品取自安徽岳西县妙道山(116.07°E, 30.83°N)。在五针松林采样区域内,采用同一样方3点混合取1个样,共采集20个混合样本。先用铲子去除五针松土壤上面的覆盖物,包括植物、一些可见根系、石粒、苔藓和凋落物等。接着采集地面以下10–20 cm处的五针松根际土壤,挖到根际暴露处,先缓慢去除大的土壤团聚体,然后用无菌刷刷下附着在五针松根际的土壤。对选定范围内的五针松进行根际土壤逐一取样,用2 mm孔径无菌筛网快速过筛,以去除植物细小碎屑,将过筛后的土壤样品放入无菌EP管中,立即在液氮中快速冷冻,并于–80°C条件下保存。

1.2 16S rRNA高通量测序

1.2.1 DNA提取扩增

每棵五针松分别取3份根际样品,然后将3份混合为1份,获得1个DNA样本。共采集20个样本,用于16S rRNA测序。分别使用DNeasy Power Soil Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)和Qubit® dsDNA Assay Kit (Life Technologies, CA, USA)提取和浓缩总DNA,并在1%琼脂糖凝胶上检测DNA降解程度和潜在污染。

1.2.2 Illumina Miseq测序

用2%琼脂糖凝胶回收20个样本的PCR产物,随后用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)纯化回收产物。使用2%琼

脂糖凝胶电泳检测, 采用 Quantus™ Fluorometer (Promega, USA) 进行检测。完成后使用 NEXTFLEX® Rapid DNA-Seq Kit 进行建库。本实验测序工作由上海美吉生物医药科技有限公司在 Miseq PE300 平台完成 (Eren et al., 2013)。

1.2.3 数据处理

使用 Trimmomatic 软件 (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>) 对原始测序样本进行质控, 用 FLASH 软件进行拼接。采用 UPARSE 软件 (Version 7.1, <http://drive5.com/uparse/>), 以 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类并剔除序列嵌合体。利用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 对每条序列的物种分类进行注释, 比对 Silva 数据库 (SSU128), 设置比对阈值为 70% (Edgar, 2010)。采用 FastTree Version 2.1.3 (<http://www.microbesonline.org/fast-tree/>) 分析大别山五针松根际微生物群落系统发生与进化关系。采用 PICRUST 软件 (<https://github.com/picrust/picrust2>) 对 16S 扩增子测序结果进行功能预测。利用 BugBase (<https://bugbase.cs.umn.edu/>) 分析工具对大别山五针松根际微生物组进行高水平表型预测分析。通过 FAPROTAX 软件 (<http://www.zoology.ubc.ca/louca/FAPROTAX/lib/php/index.php?p=Instructions>) 预测大别山五针松根际微生物总丰度前 20 物种的功能。

2 结果与讨论

2.1 大别山五针松根际微生物组成特征

20 个样本经双端序列质控拼接后得到优化序列 1 047 862 条, 获得样本优化序列碱基数 433 405 536 bp, 所有样本的序列平均长度达 413 bp。

在门级水平上进行样本序列注释分析, 结果表明, 大别山五针松根际微生物共注释到 12 个菌门, 其中优势菌门分别为变形菌门 (Proteobacteria, 平均相对丰度为 34.5%)、酸杆菌门 (Acidobacteriota, 平均相对丰度为 21.4%)、放线菌门 (Actinobacteriota, 平均相对丰度为 12.5%) 和绿弯菌门 (Chloroflexi, 平均相对丰度为 12.4%)。优势菌门占总物种相对丰度的 80.8% (图1)。

在属级水平上, 通过序列注释发现, 大别山五针松根际微生物未注释到物种分类信息平均相对丰度

占比为 42.3%。物种相对丰度占比大于 5% 的属主要为 *Xanthobacteraceae* 属 (相对丰度为 7.2%), *Subgroup_2* 属 (相对丰度为 7.0%) 和 *Elsterales* 属 (相对丰度为 6.6%) (图2)。

2.2 大别山五针松根际微生物网络互作关系

在大别山五针松根际微生物网络分析时, 当物种间节点与相邻节点之间完全相连, 此时聚类系数为 1; 当物种间相邻节点间几乎没有连接关系, 此时聚类系数接近 0。聚类系数越大, 节点越重要。选择属级水平上物种丰度在前 20 的物种进行分析, 结果表明, *Bryobacter* 属、*Bradyrhizobium* 属和 *TK10* 属聚类系数为 1, 以 *Acidobacteriota* 门和 *Proteobacteria* 门的物种与其它物种网络互作关系较为紧密。其次为 *Candidatus_Solibacter* 属, 聚类系数为 0.67, 节点数为 4; *Acidothermus* 属聚类系数为 0.50, 节点数为 4。其中 *Xanthobacteraceae* 属相连的节点数最多, 为 7, 节点的聚类系数为 0.38; 其次是 *Elsterales* 属, 节点的聚类系数为 0.30。但是 *AD3* 属和 *HSB_OF53-F07* 属节点的聚类系数为 0, 节点数分别为 1 和 3。此外, 网络分析表明大别山五针松根际细菌类群之间存在明显的正负相关性 (图3)。

2.3 大别山五针松根际微生物系统发生与进化关系

通过 FastTree 软件分析大别山五针松根际微生物群落系统发生与进化关系, 在属级水平上分类信息对应的序列, 采用邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建大别山五针松根际微生物属级分类水平总丰度前 10 的物种进化树, 结果以进化树与 reads 丰度组合图的形式呈现 (图4)。除 *Bradyrhizobium* 属和 *Xanthobacteraceae* 属外, 大别山五针松同属于一个分支。优势属 *Elsterales* 属与其它属的同源性最高, 其次是 *Acidibacter* 属。

2.4 大别山五针松根际微生物组功能预测

2.4.1 COG 功能分类统计

通过 PICRUST1 功能预测分析大别山五针松根际微生物组功能, 结果表明, 大别山五针松根际微生物组功能主要与功能预测、氨基酸运输和代谢、细胞壁/膜/膜生物发生、能量产生和转换以及信号转导机制相关 (图5)。

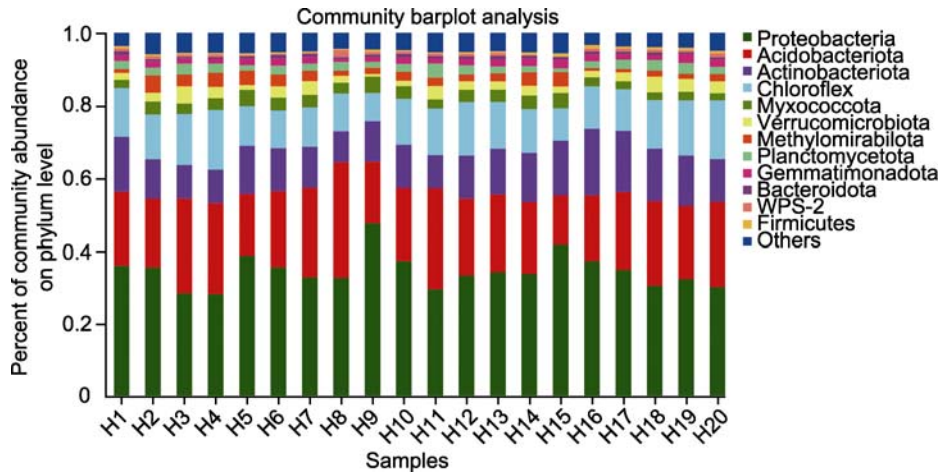


图1 大别山五针松根际微生物在门级水平上的物种组成
横坐标为样本编号，纵坐标为该样本不同物种在门级水平上所占的比例。不同颜色的柱子代表样本中不同物种，柱子的长短代表该物种所占比例的大小。

Figure 1 Species composition of rhizosphere microorganisms of *Pinus dabeshanensis* at phylum level
The abscissa is the sample number, and the ordinate is the proportion of different species in the sample at phylum level. Columns in different colors represent different species in the sample, and the height of columns represents the proportion of the species.

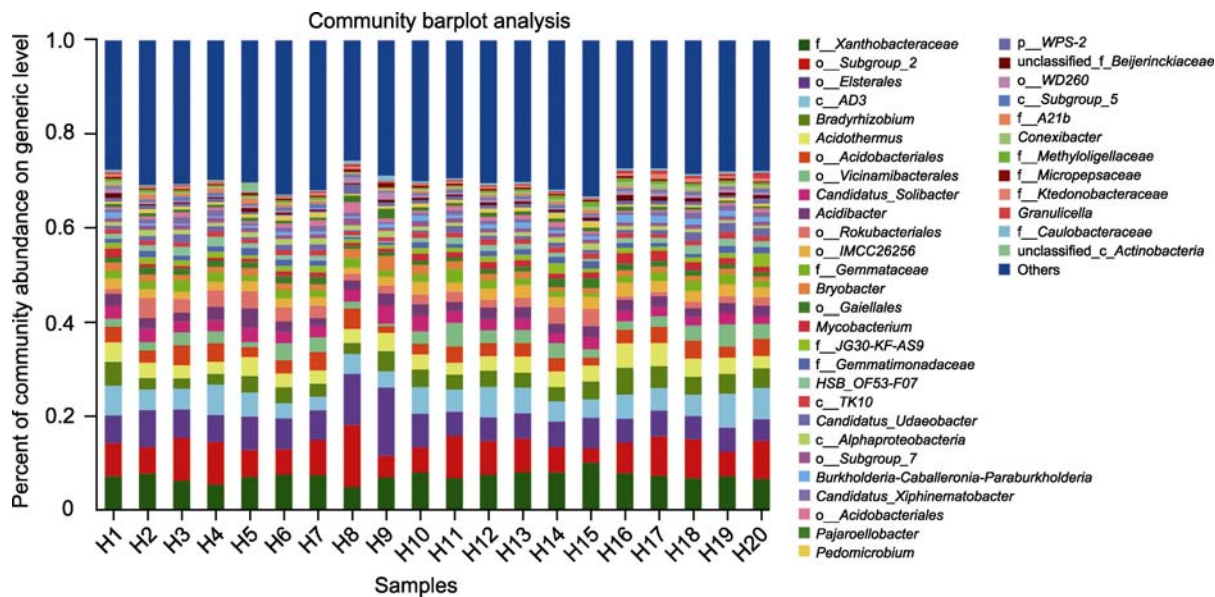


图2 大别山五针松根际微生物在属级水平上的物种组成
横坐标为样本编号，纵坐标为该样本不同物种在属级水平上所占比例，不同颜色柱子代表样本中不同的物种，柱子长短代表该物种所占比例的大小。

Figure 2 Species composition of rhizosphere microorganisms of *Pinus dabeshanensis* at generic level
The abscissa is the sample number, and the ordinate is the proportion of different species in the sample at generic level. Columns in different colors represent different species in the sample, and the height of columns represents the proportion of the species.

2.4.2 BugBase表型预测

利用BugBase分析工具对大别山五针松根际微生物

组进行高水平表型预测分析。预测得出表型类型包括革兰氏阳性(Gram positive)、革兰氏阴性(Gram

negative)、生物膜形成(biofilm forming)、致病性(pathogenic)、移动元件(mobile element containing)、氧需求(oxygen utilizing)和胁迫耐受性(stress tolerant) 7类。在门级水平上, 分类水平总丰度前10的物种-表型贡献度分析结果如图6A-I所示。

绿菌门(Chloroflexi)、放线菌门、unclassified_Bacteria、厚壁菌门(Firmicutes)和Armatimonadota对革兰氏阳性表型贡献度分别为0.11、0.22、0.001 2、0.000 3和1.077 4 e-05。酸杆菌门、变形菌门、绿菌门、Methyloirabilota和疣微菌门(Verrucomicrobiota)对革兰氏阴性表型贡献度分别为0.41、0.21、0.09、

0.05和0.03。注释到Proteobacteria对产生生物被膜表型贡献度为0.09。酸杆菌门、变形菌门、Methyloirabilota、粘菌门(Myxococcota)和硝化菌门(Nitrospirata)对具有潜在致病性表型贡献度分别为0.40、0.12、0.05、0.02和0.01。酸杆菌门、疣微菌门、肠杆菌门(Enterobacteriaceae)、GAL15和Armatimonadota对厌氧表型贡献度分别为0.04、0.002、0.001、0.000 6和0.000 3。酸杆菌门、变形菌门、绿菌门、放线菌门和疣微菌门对需氧表型贡献度分别为0.37、0.11、0.11、0.06和0.03。变形菌门、放线菌门和厚壁菌门对兼性厌氧表型贡献度分别为0.08、

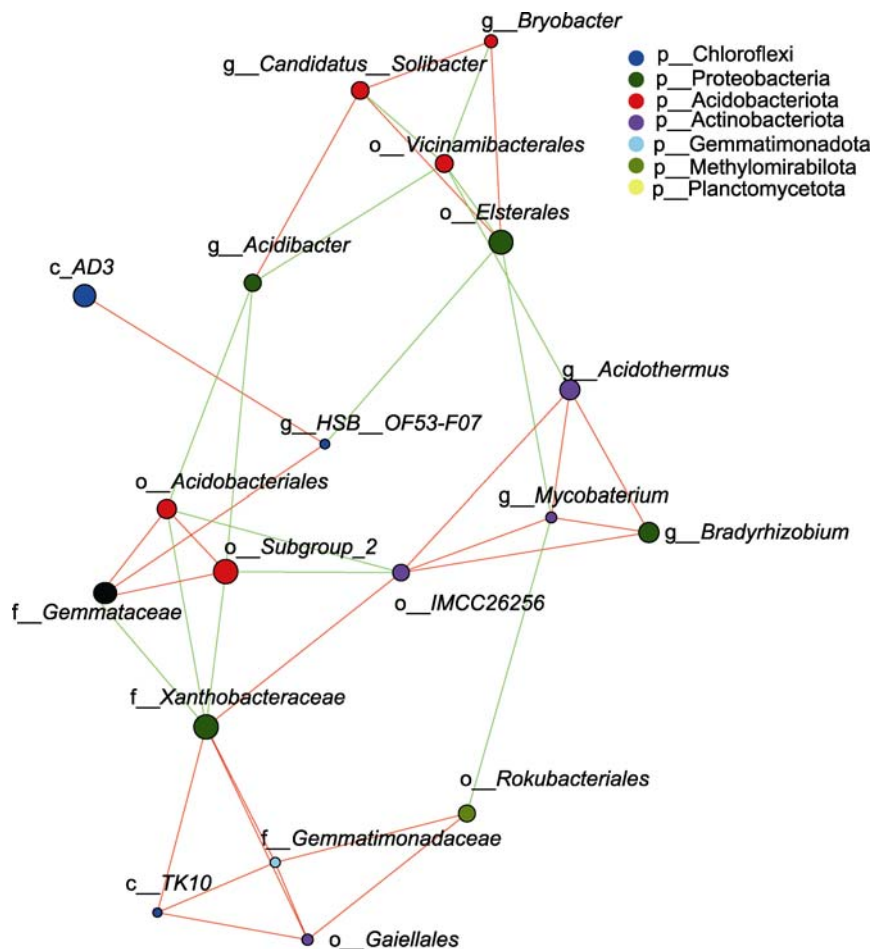


图3 大别山五针松根际微生物网络分析

节点的大小与注释到的物种丰度比例呈正相关。红色线表示正相关, 绿色线表示负相关。连接线越粗, 表示物种间相关性越高。物种间连接线越多, 表示物种间关系越密切。

Figure 3 Network analysis of rhizosphere microorganisms of *Pinus dabeshanensis*

The size of nodes correlated with the proportion of species abundance annotated. The red line indicates positive correlations and the green line indicates negative correlations. The thicker the connecting line, the higher the correlation between species. The more connecting lines between species, the closer the relationship between species.

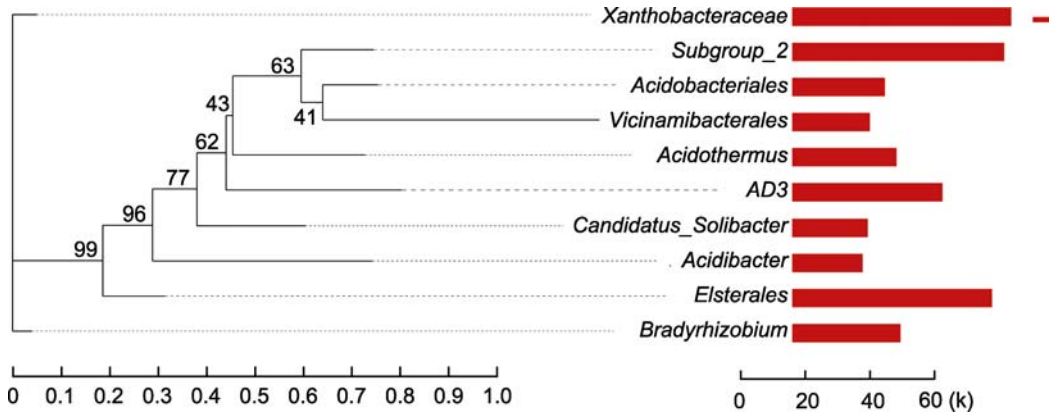


图4 大别山五针松根际微生物进化分析
系统发生进化树中每条分支代表一类物种，根据物种所属的高级分类学水平对分支进行着色，分支长度为2个物种间的进化距离，即物种的差异程度。柱状图展示物种在不同分组中的reads占比。

Figure 4 Phylogenetic analysis of rhizosphere microorganisms of *Pinus dabeshanensis*
Each branch of phylogenetic evolutionary tree represents a species. The branches are colored according to the high taxonomic level of the species. The branch length is the phylogenetic distance between the two species, that is, the degree of species difference. The bar chart shows the proportion of reads of species in different groups.

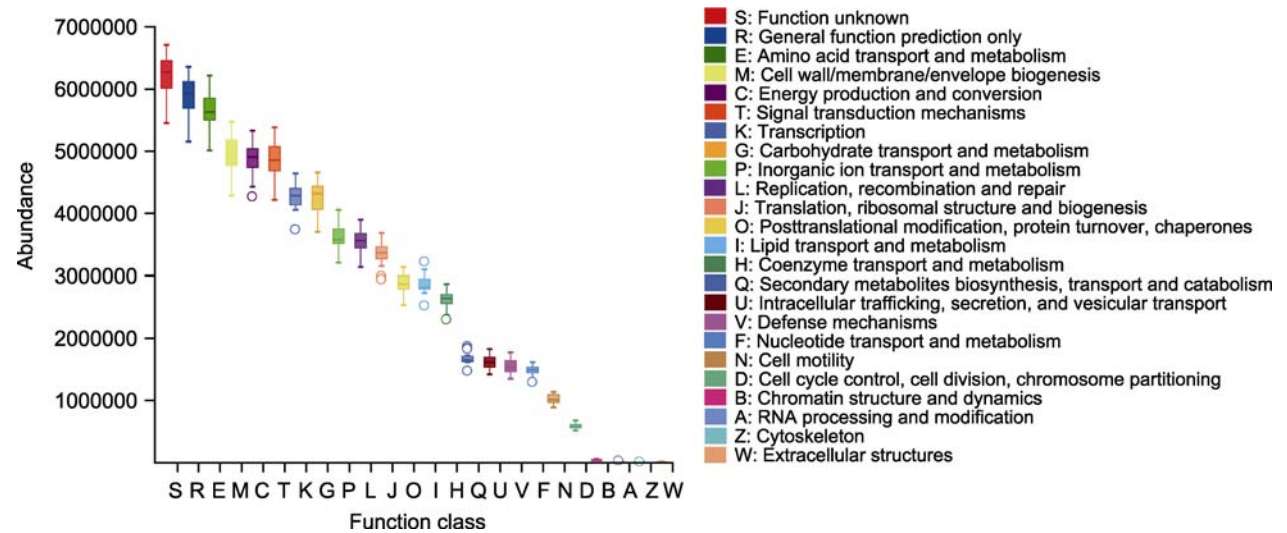


图5 大别山五针松根际微生物组蛋白相邻类的聚簇(COG)功能分类及统计分析
横坐标代表COG二级功能编号，纵坐标代表功能丰度。

Figure 5 Classification and statistical analysis of cluster of orthologous groups of proteins (COG) function of rhizosphere microbiome of *Pinus dabeshanensis*
The abscissa represents COG secondary function number, and the ordinate represents function abundance.

0.000 4和0.000 1。酸杆菌门、变形菌门、绿菌门、放线菌门和疣微菌门对胁迫耐受力表型贡献度分别为0.17、0.11、0.11、0.11和0.03。变形菌门、绿菌门、放线菌门、疣微菌门和粘菌门对移动元件表型贡献度分别为0.21、0.11、0.11、0.03和0.02。

2.4.3 FAPROTAX功能预测

FAPROTAX是将原核生物分类群(如属或种)映射到代谢或其它生态相关功能(如硝化和反硝化)人工构建的数据库。通过FAPROTAX功能预测分析大别山五针松根际微生物总丰度前20物种的功能，得到功

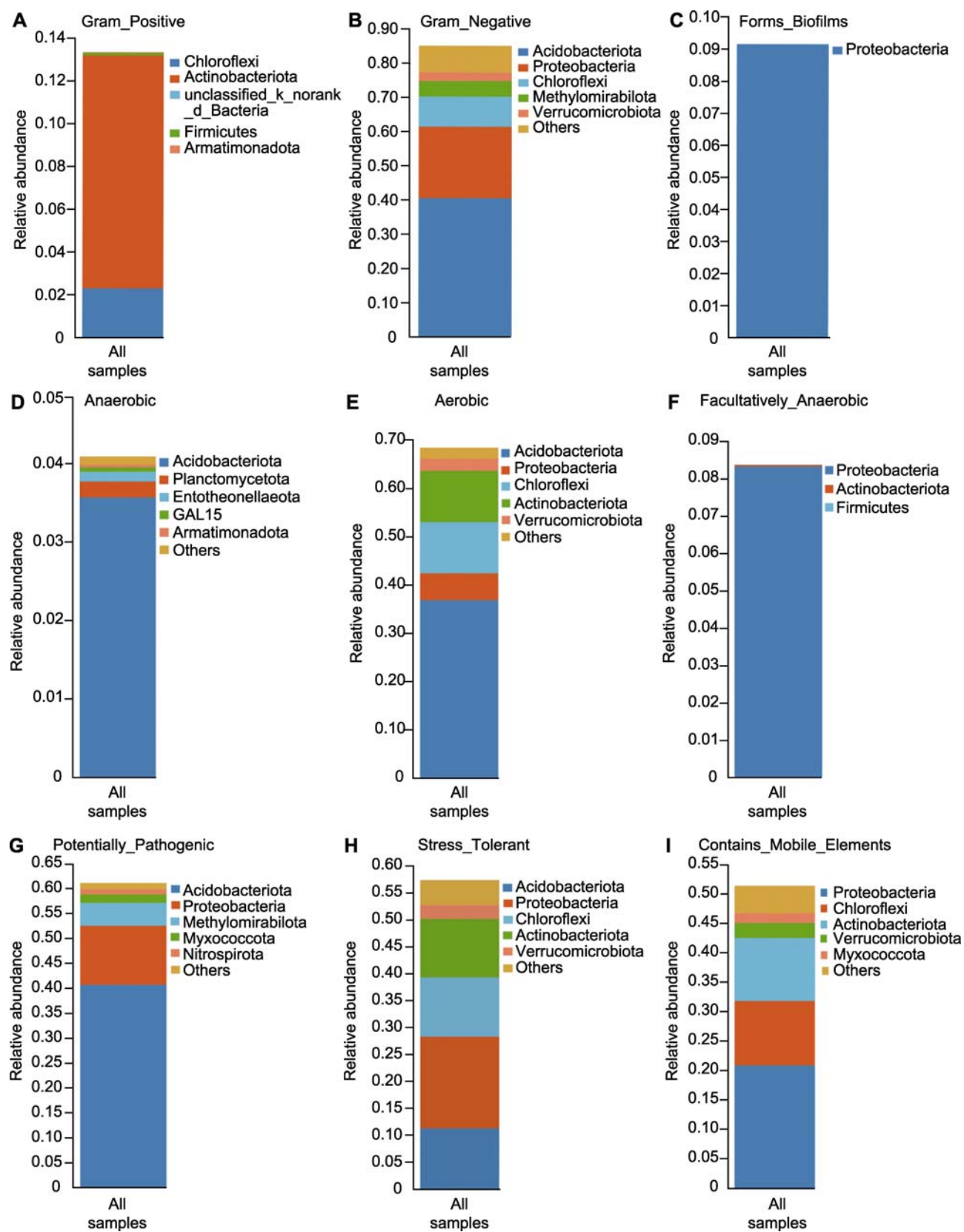


Figure 6

图6 大别山五针松根际微生物组物种-表型贡献度

(A) 革兰氏阳性表型; (B) 革兰氏阴性表型; (C) 生物膜形成表型; (D) 厌氧表型; (E) 需氧表型; (F) 兼性厌氧表型; (G) 致病性表型; (H) 耐压力表型; (I) 移动元件表型。物种-表型贡献度表示特定表型的主要物种组成, 即反映物种与表型的对应关系。横坐标为所有样品, 不同颜色图例代表不同的物种, 纵坐标为该样本中不同物种对此表型的贡献度。

Figure 6 Species-phenotype contribution of rhizosphere microbiome of *Pinus dabeshanensis*
(A) Gram positive phenotype; (B) Gram negative phenotype; (C) Biofilm forming phenotype; (D) Anaerobic phenotype; (E) Aerobic phenotype; (F) Facultatively anaerobic phenotype; (G) Pathogenic phenotype; (H) Stress tolerant phenotype; (I) Mobile element containing phenotype. The species-phenotype contribution shows the main species composition of a specific phenotype, it reflects the corresponding relationship between species and phenotype. The abscissa represents all samples, different color represents different species, and the ordinate is the contribution of different species in the sample to this phenotype.

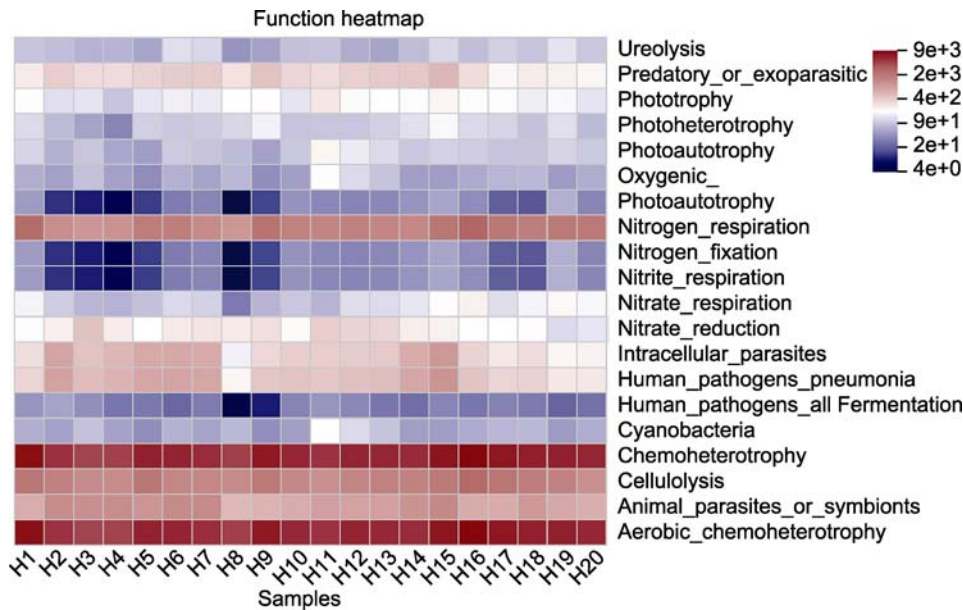


图7 大别山五针松根际微生物主要物种功能热图

横坐标为样本编号, 纵坐标为功能名称, 色块颜色梯度展示样本中不同功能的丰度变化情况。右侧为颜色梯度代表的数值。

Figure 7 Functional heatmap of main species of rhizosphere microorganisms of *Pinus dabeshanensis*
The abscissa is the sample number, the ordinate is the function name, and the color block gradient shows the abundance changes of different functions in the sample. The right side is the value represented by the color gradient.

能热图(图7)。预测结果表明, 大别山五针松根际微生物的chemoheterotrophy (化学异养)、cellulolysis (纤维素水解作用)、animal_parasites_or_symbionts (动物寄生虫或共生体)、aerobic_chemoheterotrophy (需氧化学异养)和nitrogen fixation (固氮)等功能较为丰富。

2.5 讨论

健康植物的根部聚集着较多土壤衍生的细菌和真菌等微生物群落, 它们在不同的生态环境中独立进化(Durán et al., 2018)。微生物-微生物相互作用的动力学已成为植物圈的重要特征之一, 这种相互作用对植

物健康有重要影响(Agler et al., 2016)。这些微生物如何相互作用以及这些相互作用在多大程度上影响植物健康目前尚不明确。本研究采用16S rRNA高通量测序方法分析大别山五针松根际微生物组成与功能, 旨在阐明大别山五针松根际细菌群落特征及其对大别山五针松健康生长的作用。

本研究表明, 在门级水平上, 大别山五针松根际细菌88%以上来自变形菌门、放线菌门、酸杆菌门、疣微菌门、绿弯菌门与Myxococcota门。这表明大别山五针松根际微生物群落具有丰富性和多样性的特点, 但主要优势菌仍集中在变形菌门、酸杆菌门和放线菌门。Lundberg等(2012)发现拟南芥(*Arabidopsis*

thaliana)根际土壤中变形菌门、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门、酸杆菌门、厚壁菌门和宝石单胞菌门的微生物相对丰度较高,是拟南芥根际土壤中的优势菌。Ling等(2015)发现西瓜(*Citrullus lanatus*)的根际微生物中,酸杆菌门、放线菌门、拟杆菌门、蓝细菌门(Cyanobacteria)、厚壁菌门和变形菌门是其主导细菌。另有研究表明,放线菌、拟杆菌和变形菌在大麦(*Hordeum vulgare*)根际土壤中占优势(Bulgarelli et al., 2018)。虽然不同植物根际土壤的细菌群落存在差异,但酸杆菌门、放线菌门和变形菌门是大别山五针松和上述植物的共同优势菌门,表明这些菌门可能是多数植物根际细菌群落的共同优势菌门。由于变形菌在生理、形态和代谢等方面呈现出丰富的多样性,且变形菌对碳氮循环具有重要意义(Tang et al., 2020),因此变形菌在生态系统尤其是土壤系统中占主导地位(Dai et al., 2018)。变形菌繁殖速度快,对不稳定碳源具有良好的适应性,广泛分布于全球土壤环境中(Xu et al., 2018)。一般来说,土壤样品中变形菌或酸杆菌的丰度最大。大别山五针松根际富含的微生物菌群也是其它植物根际微生物的主要群落(Mendes et al., 2014)。酸杆菌门是常见植物根际细菌群落中的优势菌,其可降解复杂的根系分泌物,如纤维素和木质素,故在植物根际碳循环中发挥重要作用(Ward et al., 2009)。

通过对大别山五针松根际微生物进行网络互作分析,表明大别山五针松根际微生物群落的中心菌门为变形菌、放线菌和酸杆菌,与我们在大别山五针松根际微生物群落中发现的优势菌门高度相似。土壤中的优势微生物相对丰富,在调节生态功能方面发挥重要作用(Delgado-Baquerizo et al., 2016)。变形菌和放线菌在根际和非根际环境中富集,这与其具有较强的适应性有关(滕泽栋等, 2017)。此外,变形菌门在适应环境变化和抵御逆境胁迫方面也发挥重要作用(Campbell et al., 2006)。放线菌能够对土壤中的有毒染料三苯甲烷进行降解脱色,并有助于植物适应干旱环境(Warrad et al., 2020)。因此,我们推测变形菌和放线菌是重要的植物根际微生物群落,并在植物根际发挥调节作用。

通过对大别山五针松根际微生物进行PICRUST1功能预测,发现其微生物组功能主要为氨基酸运输和代谢、细胞壁/膜/膜生物发生、能量产生和转换以及

信号转导机制等。FAPROTAX功能预测表明,化学异养、纤维素水解作用、需氧化学异养和固氮等功能较为丰富。由此推测大别山五针松根际富含的优势菌群对植物健康生长具有重要作用。本研究揭示了大别山五针松根际细菌群落特征和功能,可为大别山五针松根际微生物资源开发与利用提供重要依据。

参考文献

- 宋健, 张海剑, 刘莉, 杜立新, 柳健虎, 曹伟平 (2020). 高通量测序分析高温覆膜对韭菜根际微生物多样性的影响. 中国生物防治学报 **36**, 938–945.
- 滕泽栋, 李敏, 朱静, 宋明阳 (2017). 野鸭湖湿地芦苇根际微生物多样性与磷素形态关系. 环境科学 **38**, 4589–4597.
- 王孝林, 王二涛 (2019). 根际微生物促进水稻氮利用的机制. 植物学报 **54**, 285–287.
- 王亚茹, 田宝玉, 张碧尧, 范競文, 戈峰, 王国红 (2021). 饵料蛋白水平对德国小蠊肠道细菌群落的影响. 生态学报 **41**, 5495–5505.
- Agler MT, Ruhe J, Kroll S, Morhenn C, Kim ST, Weigel D, Kemen EM (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS Biol* **14**, e1002352.
- Babalola OO, Emmanuel OC, Adeleke BS, Odelade KA, Nwachukwu BC, Ayiti OE, Adegboyega TT, Igiehon NO (2021). Rhizosphere microbiome cooperations: strategies for sustainable crop production. *Curr Microbiol* **78**, 1069–1085.
- Bano S, Wu XG, Zhang XJ (2021). Towards sustainable agriculture: rhizosphere microbiome engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* **105**, 7141–7160.
- Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci* **17**, 478–486.
- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch PC, Weiman A, Dröge J, Pan Y, McHardy AC, Schulze-Lefert P (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe* **17**, 392–403.
- Campbell BJ, Engel AS, Porter ML, Takai K (2006). The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nat Rev Microbiol* **4**, 458–468.
- Dai ZM, Su WQ, Chen HH, Barberán A, Zhao HC, Yu MJ, Yu L, Brookes PC, Schadt CW, Chang SX, Xu JM (2018). Long-term nitrogen fertilization decreases bacterial diversity and favors the growth of *Actinobacteria* and *Proteobacteria* in agro-ecosystems across the globe. *Glob Chang Biol* **24**, 3452–3461.

- Delgado-Baquerizo M, Grinyer J, Reich PB, Singh BK, Allen E** (2016). Relative importance of soil properties and microbial community for soil functionality: insights from a microbial swap experiment. *Funct Ecol* **30**, 1862–1873.
- Durán P, Thiergart T, Garrido-Oter R, Agler M, Kemen E, Schulze-Lefert P, Hacquard S** (2018). Microbial inter-kingdom interactions in roots promote *Arabidopsis* survival. *Cell* **175**, 973–983.
- Edgar RC** (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460–2461.
- Eren AM, Vineis JH, Morrison HG, Sogin ML** (2013). A filtering method to generate high quality short reads using illumina paired-end technology. *PLoS One* **8**, e66643.
- Fierer N** (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat Rev Microbiol* **15**, 579–590.
- Fu LK, Chin CM** (1992). China Plant Red Data Book: Rare and Endangered Plants. Beijing: Science Press. pp. 46–47.
- Jacoby RP, Chen L, Schwier M, Koprivova A, Kopriva S** (2020). Recent advances in the role of plant metabolites in shaping the root microbiome. *F1000Res* **9**, 151.
- Keswani C, Prakash O, Bharti N, Vilchez JI, Sansinenea E, Lally RD, Borriss R, Singh SP, Gupta VK, Fraceto LF, de Lima R, Singh HB** (2019). Re-addressing the biosafety issues of plant growth promoting rizobacteria. *Sci Total Environ* **690**, 841–852.
- Li YB, Li Q, Chen SF** (2021). Diazotroph *Paenibacillus tritici* BJ-18 drives the variation in bacterial, diazotrophic and fungal communities in the rhizosphere and root/shoot endosphere of maize. *Int J Mol Sci* **22**, 1460.
- Ling N, Song Y, Raza W, Huang QW, Guo SW, Shen QR** (2015). The response of root-associated bacterial community to the grafting of watermelon. *Plant Soil* **391**, 253–264.
- Lucas G, Synghe H** (1978). The IUCN Plant Red Data Book: Comprising Red Data Sheets on Two Hundred-fifty Selected Plants Threatened on a World Scale. Gland: IUCN. pp. 365–366.
- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, del Rio TG, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl JL** (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* **488**, 86–90.
- Mendes LW, Kuramae EE, Navarrete AA, van Veen JA, Tsai SM** (2014). Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *ISME J* **8**, 1577–1587.
- Nihorimbere V, Ongena M, Smargiassi M, Thonart P** (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol Agron Soc Environ* **15**, 327–337.
- Noman M, Ahmed T, Ijaz U, Shahid M, Azizullah, Li DY, Manzoor I, Song FM** (2021). Plant-microbiome crosstalk: dawning from composition and assembly of microbial community to improvement of disease resilience in plants. *Int J Mol Sci* **22**, 6852.
- Qu Q, Zhang ZY, Peijnenburg WJGM, Liu WY, Lu T, Hu BL, Chen JM, Chen J, Lin ZF, Qian HF** (2020). Rhizosphere microbiome assembly and its impact on plant growth. *J Agric Food Chem* **68**, 5024–5038.
- Reinhold-Hurek B, Büniger W, Burbano CS, Sabale M, Hurek T** (2015). Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. *Annu Rev Phytopathol* **53**, 403–424.
- Sarkar J, Chakraborty B, Chakraborty U** (2018). Plant growth promoting rhizobacteria protect wheat plants against temperature stress through antioxidant signaling and reducing chloroplast and membrane injury. *J Plant Growth Regul* **37**, 1396–1412.
- Tang HM, Xiao XP, Li C, Pan XC, Cheng KK, Li WY, Wang K** (2020). Microbial carbon source utilization in rice rhizosphere and nonrhizosphere soils with short-term manure N input rate in paddy field. *Sci Rep* **10**, 6487.
- Tian L, Chang JJ, Shi SH, Ji L, Zhang JF, Sun Y, Li XJ, Li XJ, Xie HW, Cai YH, Chen DZ, Wang JL, van Veen JA, Kuramae EE, Tran LSP, Tian CJ** (2022). Comparison of methane metabolism in the rhizomicrobiomes of wild and related cultivated rice accessions reveals a strong impact of crop domestication. *Sci Total Environ* **803**, 150131.
- Tiepo AN, Hertel MF, Rocha SS, Calzavara AK, De Oliveira ALM, Pimenta JA, Oliveira HC, Bianchini E, Stolf-Moreira R** (2018). Enhanced drought tolerance in seedlings of Neotropical tree species inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol Biochem* **130**, 277–288.
- Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, Sa TM, Singh BK** (2021). Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat Rev Microbiol* **18**, 607–621.
- Ward NL, Challacombe JF, Janssen PH, Henrissat B, Coutinho PM, Wu M, Xie G, Haft DH, Sait M, Badger J, Barabote RD, Bradley B, Brettin TS, Brinkac LM, Bruce D, Creasy T, Daugherty SC, Davidsen TM, De-Boy RT, Detter JC, Dodson RJ, Durkin AS, Ganapathy A, Gwinn-Giglio M, Han CS, Khouri H, Kiss H, Kothari SP, Madupu R, Nelson KE, Nelson WC, Paulsen I, Penn K, Ren QH, Rosovitz MJ, Selengut JD, Shrivastava S, Sullivan SA, Tapia R, Thompson LS, Watkins KL, Yang Q, Yu CH, Zafar N, Zhou LW, Kuske CR** (2009). Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl Environ Microbiol* **75**, 2046–2056.

Warrad M, Hassan YM, Mohamed MSM, Hagagy N, Al-Maghrabi OA, Selim S, Saleh AM, AbdElgawad H (2020). A bioactive fraction from *Streptomyces* sp. enhances maize tolerance against drought stress. *J Microbiol Biotechnol* **30**, 1156–1168.

Xu J, Zhang YZ, Zhang PF, Trivedi P, Riera N, Wang YY, Liu X, Fan GY, Tang JL, Coletta-Filho HD, Cubero J, Deng XL, Ancona V, Lu ZJ, Zhong BL, Roper MC, Capote N, Catara V, Pietersen G, Vernière C, Al-Sadi AM, Li L, Yang F, Xu X, Wang J, Yang HM, Jin T, Wang N (2018). The structure and function of the global citrus

rhizosphere microbiome. *Nat Commun* **9**, 4894.

Zhu ZK, Ge TD, Hu YJ, Zhou P, Wang TT, Shibistova O, Guggenberger G, Su YR, Wu JS (2017). Fate of rice shoot and root residues, rhizodeposits, and microbial assimilated carbon in paddy soil-part 2: turnover and microbial utilization. *Plant Soil* **416**, 243–257.

Zhu ZK, Ge TD, Liu SL, Hu YJ, Ye RZ, Xiao ML, Tong CL, Kuzyakov Y, Wu JS (2018). Rice rhizodeposits affect organic matter priming in paddy soil: the role of N fertilization and plant growth for enzyme activities, CO₂ and CH₄ emissions. *Soil Biol Biochem* **116**, 369–377.

Characteristics and Function Analysis of Rhizosphere Bacterial Community of Endangered Plant *Pinus dabeshanensis*

Shuiqin Shi^{1†}, Huaguang Qin^{1†}, Jingjing Zhang¹, Yu Han¹, Hao Yu¹, Yining Peng², Shao Yang¹, Jiayi Wang¹, Guangyu He¹, Zehua Qi¹, Wenjie Wu², Xingyu Zhu¹, Yuchun Rao^{2*}, Dan Mu^{1*}

¹The Province Key Laboratory of the Biodiversity Study and Ecology Conservation in Southwest Anhui, School of Life Sciences, Anqing Normal University, Anqing 246133, China; ²School of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract Plant rhizosphere microbial community markedly impact on the healthy growth of plants, and each plant rhizosphere has its own specific microbial community. *Pinus dabeshanensis* was listed as an endangered species by the International Union for Conservation of Nature, and it is very important for scientific research. In order to explore the characteristics and functions of rhizosphere bacterial community of this endangered species, high-throughput sequencing and bioinformatics analysis on bacterial 16S rRNA were used. The results showed that the major species of rhizosphere microorganisms of *P. dabeshanensis* were Proteobacteria, Actinobacteriota, Acidobacteriota and Verrucomicrobiota. Network analysis showed that there were significant correlations among rhizosphere bacterial groups of *P. dabeshanensis*, *Bryobacter*, *Bradyrhizobium* and an unidentified genus *TK10* were important nodes in the network. PICRUST1 function prediction indicated that the microbiome functions mainly involved with amino acid transport and metabolism, cell wall/membrane/membrane biogenesis, energy production and conversion. The functional prediction of FAPROTAX showed that the dominant flora in the rhizosphere of *P. dabeshanensis* had functions enriched in such processes as chemical heterotrophic, cellulose hydrolysis, aerobic chemical heterotrophic and nitrogen fixation, which plays an important role in plant growth and development. The results of this study provide a research basis for cultivating healthy rhizosphere microbial flora for *P. dabeshanensis*, and for the development and utilization of microbial resources for a better growth of plants.

Key words endangered species, *Pinus dabeshanensis*, rhizosphere bacteria, high throughput sequencing, flora characteristics

Shi SQ, Qin HG, Zhang JJ, Han Y, Yu H, Peng YN, Yang S, Wang JY, He GY, Qi ZH, Wu WJ, Zhu XY, Rao YC, Mu D (2022). Characteristics and function analysis of rhizosphere bacterial community of endangered plant *Pinus dabeshanensis*. *Chin Bull Bot* **57**, 457–467.

† These authors contributed equally to this paper

* Authors for correspondence. E-mail: ryc@zjnu.cn; mudansmile@126.com