

研究报告

荒漠植物黑沙蒿嫩枝与成熟枝内生菌群落结构差异

乌吉斯古冷¹, 康鹏^{*1,2,3}, 胡金鹏¹, 潘雅清⁴, 周月¹, 马蓉¹, 彭伊扬¹, 刘建利^{1,2,3}

1 北方民族大学生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021

2 国家民委黄河流域农牧交错区生态保护重点实验室, 宁夏 银川 750021

3 宁夏特殊生境微生物资源开发与利用重点实验室, 宁夏 银川 750021

4 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021

乌吉斯古冷, 康鹏, 胡金鹏, 潘雅清, 周月, 马蓉, 彭伊扬, 刘建利. 荒漠植物黑沙蒿嫩枝与成熟枝内生菌群落结构差异[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 569-582

Wujisiguleng, Kang Peng, Hu Jinpeng, Pan Yaqing, Zhou Yue, Ma Rong, Peng Yiyang, Liu Jianli. Difference in endophyte community structure between young and mature branches of *Artemisia ordosica*[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 569-582

摘要:【背景】黑沙蒿是我国北方沙漠地区分布广泛、抗旱性能优良的固沙灌木, 对稳定沙漠地区生态系统有至关重要的作用。【目的】内生菌在植物生命过程中扮演着重要角色, 认识植物生长发育阶段幼嫩和成熟组织内生菌群的结构变化, 对于理解菌群间的相互作用及保护宿主植物抵御生物和非生物胁迫具有积极意义。【方法】以宁夏拉巴湖林场黑沙蒿为研究对象, 对其嫩枝和成熟枝木质化相关指标进行测定并对其内生菌群落进行高通量测序分析。【结果】黑沙蒿茎枝不同发育阶段木质素和纤维素差异显著, 嫩枝内生细菌、真菌的多样性高于成熟枝, 具有更多的 OTU; 成熟枝则通过木质素、纤维素的积累, 表现出较高的环境适应能力; 随着黑沙蒿茎枝的不断发育, 内生真菌群落变化较为明显, 优势门出现未识别真菌菌门替代子囊菌门的趋势。【结论】黑沙蒿茎枝不同发育阶段对植物微生物组的组装有深刻的影响, 内生细菌和真菌微生物组在植物发育的不同阶段起着不同的生态作用。本研究揭示了黑沙蒿茎枝发育过程中内生细菌、真菌群落结构的差异, 为荒漠地区生态恢复提供理论参考。

关键词: 木质化; 内生细菌; 内生真菌; 黑沙蒿

基金项目: 北方民族大学科研启动资助项目(2019KYQD30); 北方民族大学大学生创新创业训练计划项目(2020TDXM078); 国家自然科学基金(31960346); 宁夏特色微生物资源开发与利用科技创新团队建设项目(2019TSW06)

Supported by: Scientific Research Start-Up Foundation of the North Minzu University (2019KYQD30); Innovation and Entrepreneurship Training Foundation of the North Minzu University (2020TDXM078); National Natural Science Foundation of China (31960346); Ningxia Special Microbial Resources Development and Utilization Science and Technology Innovation Team Building Fund (2019TSW06)

*Corresponding author: E-mail: kangpeng@nmu.edu.cn

Received: 2021-06-09; Accepted: 2021-09-13; Published online: 2021-10-25

Difference in endophyte community structure between young and mature branches of *Artemisia ordosica*

Wujisiguleng¹, KANG Peng^{*1,2,3}, HU Jinpeng¹, PAN Yaqing⁴, ZHOU Yue¹, MA Rong¹, PENG Yiyang¹, LIU Jianli^{1,2,3}

1 School of Biological Science and Engineering, North Minzu University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

2 Key Laboratory of Ecological Protection of Agro-Pastoral Ecotones in the Yellow River Basin, National Ethnic Affairs Commission of the People's Republic of China, Yinchuan 750021, Ningxia, China

3 Ningxia Key Laboratory for Development and Application of Microbial Resources in Extreme Environments, Yinchuan 750021, Ningxia, China

4 School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

Abstract: [Background] The drought-resistant sand-fixing shrub *Artemisia ordosica*, which is widely distributed in the desert area in northern China, plays an important role in stabilizing the ecosystem in desert area. **[Objective]** Endophyte plays an essential part in plant life. It is of great significance for understanding the interaction among microbial communities and protecting host plants against biotic and abiotic stresses to clarify the structure variation of endophytic communities in young and mature tissues of plants during growth and development. **[Methods]** In this study, we measured the lignification indices of young and mature branches of *A. ordosica* from Labahu Forest Farm in Ningxia and performed high-throughput sequencing of the endophyte communities. **[Results]** Content of lignin and cellulose was significantly different between *A. ordosica* branches at different development stages. The diversity of endophytic bacteria and fungi in young branches was higher than that in mature branches, and more OTUs were found in the former than in the later. Mature branches accumulated lignin and cellulose, thus boasting stronger adaptability. With the development of branches, endophytic fungal community changed more significantly, as the unidentified phylum gradually took the position of *Ascomycota* as the dominant phylum. **[Conclusion]** Development stage of *A. ordosica* branches has profound impact on the assembly of plant microbiome. Endophytic bacteria and fungi play different ecological roles at different development stages of plants. We revealed the difference in the community structure of endophytic bacteria and fungi between young and mature branches of *A. ordosica*, hoping to provide a reference for ecological restoration in desert area.

Keywords: lignification; endophytic bacteria; endophytic fungi; *Artemisia ordosica*

植物整个生命周期中易受各种生物和非生物胁迫的影响, 包括感染性生物引起的细菌、病毒和真菌侵染, 以及干旱、水淹、盐碱、重金属污染和营养缺乏等^[1]。然而, 高等植物在漫长进化过程中通过一系列形态、生理和生化特征的改变, 能有效避免和/或忍受逆境因子并存活^[2]。许多研究指出, 植物生长和应对胁迫的能力同样取决于内部微生物群落的复杂作

用^[3-5]。尤其在中国西北干旱荒漠区, 旱生灌木对于该区的生态恢复具有积极意义, 现今的研究热点也逐渐聚焦于旱生植物-微生物相互作用方面^[6-8]。

植物内生菌指定殖在植物内部组织的细菌和真菌的集合^[9-10]。植物内生菌菌群结构受各种生物因素的影响, 如植物物种或品种、发育阶段或与其他微生物的相互作用^[11-14], 以及非生

物因素, 包括温度、辐射、季节或土壤的物理化学性质等^[15-20]。内生菌在宿主植物中的作用可分为促生菌、病原菌和共生内生菌, 其中促生菌利于植物生长、抵御逆境; 病原菌在生物或非生物胁迫条件下会降低植物的抗逆性并引发病害^[21]。最近的研究表明, 微生物群落结构和宿主健康在很大程度上受到宿主、微生物和环境之间复杂和动态的相互作用影响, 但控制植物-微生物-环境相互作用的生态过程仍然知之甚少^[22-24]。

植物内生细菌通常由变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)等组成^[10]; 内生真菌则大部分属于子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycete*)^[8,25]。鉴于植物内生菌菌群结构的变化往往受多种因素的影响, 这使得了解植物内部微生物群落对环境的动态反馈较为困难^[1]。最近的研究表明, 植物通过调节细菌的内生菌群落结构来响应不同发育阶段的不同生理状态, 尤其是植物组织类型、生长阶段和营养物质摄取均影响宿主内生菌群落的组成^[26-28]。

黑沙蒿(*Artemisia ordosica*)广泛分布于我国北方荒漠地区, 是一种优良的固沙灌木, 能在干旱等恶劣生境下繁育, 内生微生物能够增强宿主对生物胁迫和非生物胁迫的抗性。然而, 黑沙蒿嫩枝和成熟枝内生微生物组的结构差异尚不清楚。通过分析黑沙蒿的内生细菌和真菌, 对认识黑沙蒿茎枝不同发育阶段的生态作用具有指导意义, 对于稳定与改良当地生态系统至关重要^[29-30]。因此, 本研究以黑沙蒿为研究对象, 通过高通量测序技术, 揭示黑沙蒿嫩枝和成熟枝组织中内生细菌、真菌群落结构的差异, 为荒漠地区的生态恢复提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

研究样地位于宁夏拉巴湖林场(E106°52'45"-106°54'25"; N38°44'45"-38°47'1"), 于2020年8月进行取样研究。选择长势相对一致的黑沙蒿, 用无菌剪分别剪取植株同枝条嫩枝(young branch, YB)和成熟枝(mature branch, MB)组织, 每9株黑沙蒿作为一个重复, 取样品置于无菌离心管中用车载冰箱带回实验室。先将已分类的黑沙蒿茎枝用无菌水清洗4-5次, 之后用70%的乙醇浸泡5 min, 再用5%的次氯酸钠溶液浸泡5 min, 在无菌条件下用无菌水淋洗后晾干。将处理后的样品置于-80 °C保藏。

多功能酶标仪、高速冷冻离心机, 赛默飞世尔科技有限公司; 电子天平, 梅特勒托利多仪器上海有限公司; 纯水仪, 四川优普超纯科技有限公司; 水浴锅, 上海力辰仪器科技有限公司。

1.2 黑沙蒿茎枝木质化指标测定

根据苏州科铭生物有限公司木质素(lignin)、纤维素(cellulose)、半纤维素(hemicellulose)和原果胶(protopectin)含量测试盒方法对上述指标进行测定, 采用SPSS 25.0软件对数据进行单因素方差分析(ANOVA), 邓肯多范围检验在显著性水平($P < 0.05$)上确定平均值之间的显著差异, 所有数据均以均数±标准误($n=6$)表示。

1.3 黑沙蒿茎枝DNA提取和PCR扩增

采用十二烷基磺酸钠法(SDS)提取黑沙蒿茎枝的内生细菌和真菌总DNA。使用引物799F(5'-GCGAGTAAAACMGGATTAGATACCKG-3')和1193R(5'-ACGTCATCCCCACCTTCC-3')扩增细菌16S rRNA基因的V5-V7区域, 使用引物ITS1-1F-F(5'-CGTACGCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS1-1F-R(5'-GCTGCGTTC

TTCATCGATGC-3')扩增真菌 ITS1-ITS2 区域。PCR 反应条件: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 次循环; 72 °C 5 min。扩增产物纯化后进行文库构建, 文库检测合格后使用 NovaSeq 6000 进行测序。DNA 提取、PCR 扩增和测序均委托北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.4 黑沙蒿茎枝内生细菌、真菌多样性分析

测序结果使用 FLASH V1.2.7 进行拼接, 得到的拼接序列用 QIIME V1.9.1 进行质控得到有效数据, 利用 UPARSE 算法(V7.0.1001)对所有序列进行 OTU 聚类(97%相似度), 并进行物种注释。获得的数据上传至 NCBI SRA 数据库(序列号为 PRJNA719712 和 PRJNA719714)。

使用 QIIME 软件计算 OTU、Chao1、Shannon、Simpson 和 ACE 指数, 使用 R 软件(V4.1.0)进行 α 多样性指数组间差异分析; 使用 R 软件“Vegan”包进行非度量多维尺度(non-metric multidimensional scaling, NMDS)分析。使用 LEfSe 软件(LDA score>3.3)进行 LDA 分析; 基于 GreenGene 数据库中 OTU 的 tree, 进行细菌 PICRUS1 和真菌 FUNGuild 功能预测。

2 结果与分析

2.1 黑沙蒿嫩枝、成熟枝木质化程度差异

通过木质素、纤维素、半纤维素和果胶含量在黑沙蒿嫩枝及成熟枝中的差异分析可见, 黑沙蒿成熟枝木质素含量高出于嫩枝 16.1%, 差异显著($P<0.01$) (图 1A); 黑沙蒿成熟枝纤维素含量高出于嫩枝 41.6% ($P<0.001$) (图 1B), 但半纤维素和果胶含量在嫩枝和成熟枝中无明显差异(图 1C、1D)。

2.2 黑沙蒿嫩枝、成熟枝内生菌群落多样性

基于 Illumina Nova 测序平台测序, 质控后平均获得 58 954 个细菌和 99 041 个真菌高质量序列, 在 97%的序列相似性水平上聚集到 202 个细菌和 1 007 个真菌 OTU。根据物种注释情况, 进一步计算 α 多样性与 β 多样性, 结果表明, 黑沙蒿嫩枝内生细菌的 OTU 数量和 Shannon 指数高于成熟枝(图 2A、2B)、Simpson 指数低于成熟枝(图 2C)、ACE 指数和 Chao1 指数均高于成熟枝(图 2D、2E); 嫩枝内生真菌的 OTU 数量高于成熟枝(图 2F)、Shannon 指数和 Simpson 指数无显著差异(图 2G、2H)、ACE 指数和 Chao1 指数高于成熟枝(图 2I、2J)。

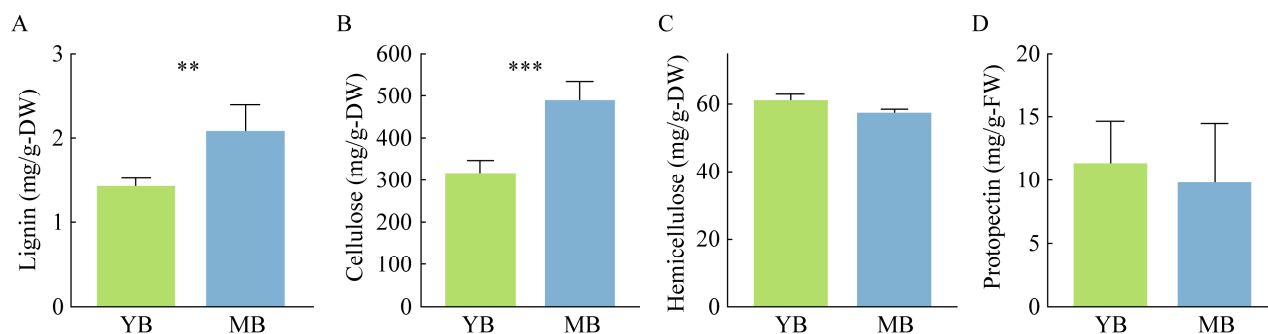


图 1 黑沙蒿茎枝木质化指标差异分析 A: 木质素含量; B: 纤维素含量; C: 半纤维素含量; D: 果胶含量。**: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 1 Analysis on the lignification index of *Artemisia ordosica*. A: Lignin content; B: Cellulose content; C: Hemicellulose content; D: Propectin content. **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

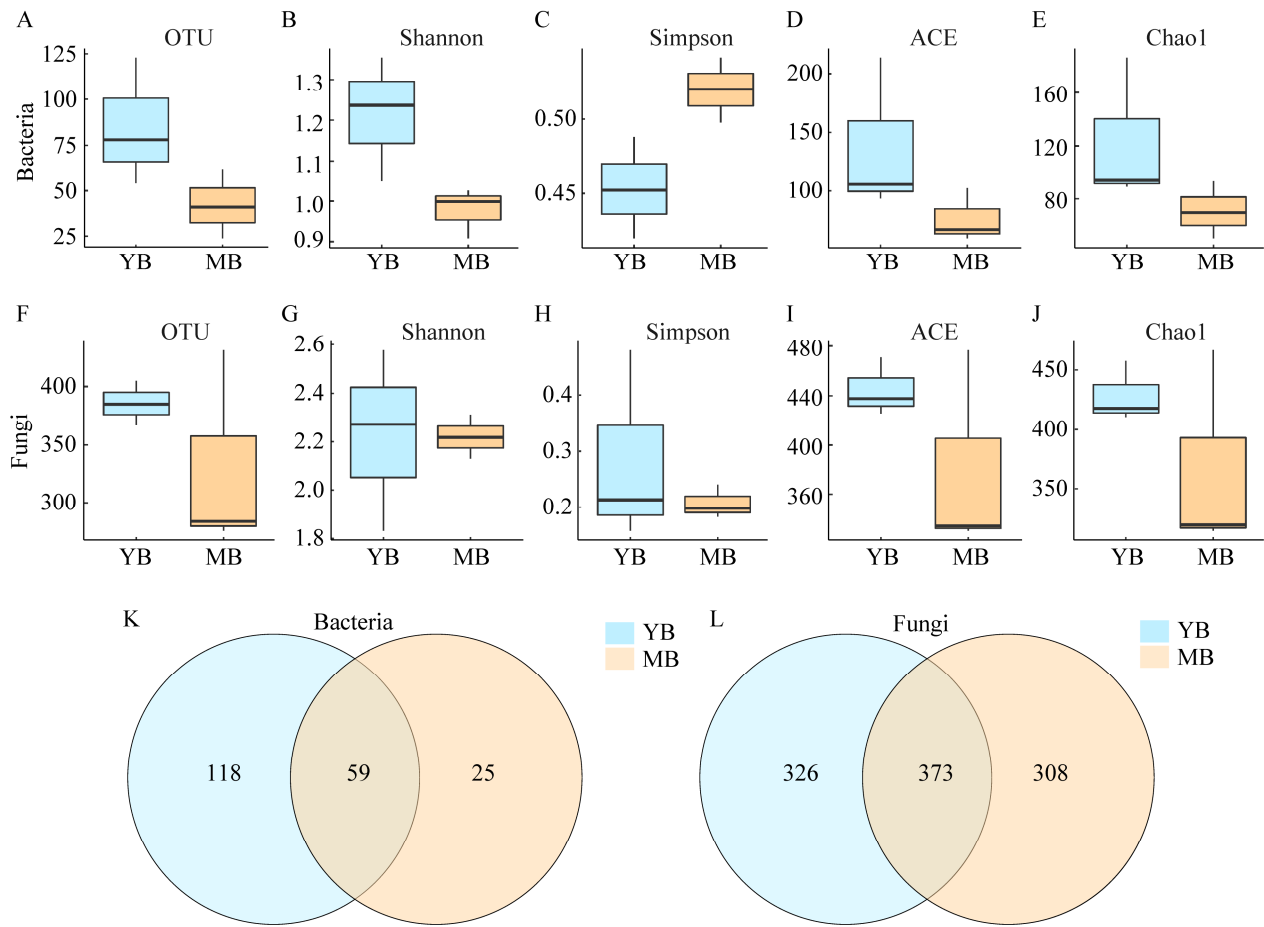


图2 黑沙蒿茎枝内生细菌和真菌 α 多样性及 Venn 图分析 A-E: 内生细菌 OTU 数量、Shannon 指数、Simpson 指数、ACE 指数和 Chao1 指数; F-J: 内生真菌 OTU 数量、Shannon 指数、Simpson 指数、ACE 指数和 Chao1 指数; K: 内生细菌共有和特有 OTU 数量; L: 内生真菌共有和特有 OTU 数量

Figure 2 Analysis on the alpha diversity and Venn diagram of endophytic bacteria and fungi in *Artemisia ordosicas*. A-E: OTU numbers, Shannon index, Simpson index, ACE index and Chao1 index of endophytic bacteria; F-J: OTU numbers, Shannon index, Simpson index, ACE index and Chao1 index of endophytic fungi; K: Common and unique OTU numbers of endophytic bacteria; L: Common and unique OTU numbers of endophytic fungi.

维恩图分析可见, 在内生细菌中, 黑沙蒿嫩枝特有 118 个 OTU, 成熟枝特有 25 个 OTU, 嫩枝和成熟枝共有 59 个 OTU (图 2K); 内生真菌中, 嫩枝特有 326 个 OTU, 成熟枝特有 308 个 OTU, 嫩枝和成熟枝共有 373 个 OTU (图 2L); 可见, 嫩枝中均较成熟枝具有更多特有 OTU。进一步将黑沙蒿茎枝内生细菌、真菌进行

NMDS 分析, 结果表明嫩枝和成熟枝内生细菌间表现出差异性(图 3)。

2.3 黑沙蒿嫩枝、成熟枝内生菌群落结构变化

物种注释后, 黑沙蒿茎枝内生细菌门水平占据主导地位的有蓝细菌门(*Cyanobacteria*)和变形菌门(*Proteobacteria*); 内生真菌门水平占据主导地位的有子囊菌门(*Ascomycota*)和担子

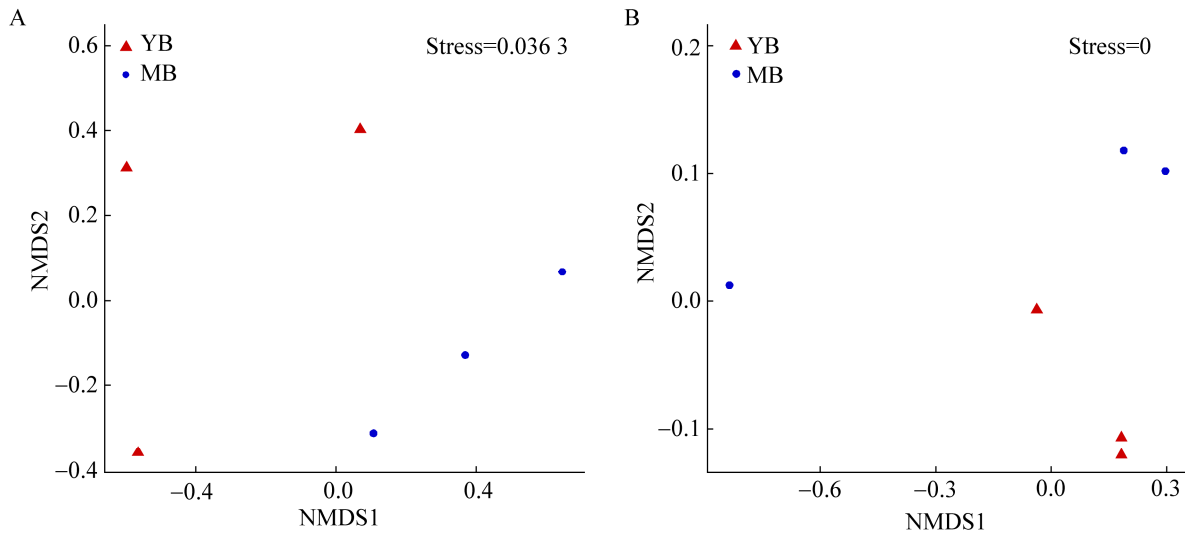


图3 黑沙蒿茎枝内生细菌(A)和内生真菌(B)非度量多维尺度分析

Figure 3 NMDS analysis on the endophytic bacteria (A) and endophytic fungi (B) of *Artemisia ordosica*.

菌门(*Basidiomycota*)。黑沙蒿嫩枝和成熟枝内生细菌菌门无显著差异(图 4A);黑沙蒿嫩枝和成熟枝内生细菌属水平上并无太大变化,未识别细菌菌属的占比逐渐增大(图 4B)。内生真菌中,黑沙蒿嫩枝具有更高的子囊菌门占比,而成熟枝中未识别的菌门具有较大占比(图 4C)。值得注意的是,随着黑沙蒿茎枝的不断发育,优势门出现未识别真菌菌门替代 *Ascomycota* 的趋势。相较于内生细菌菌属,内生真菌菌属的变化较为明显,除了未识别真菌菌属的占比出现与菌门相同的变化趋势外,链格孢属(*Alternaria*)的占比呈现上升趋势,而圆盘菌属(*Orbilia*)、*Phaeococcomyces* 和 *Entodesmium* 占比下降趋势明显(图 4D)。

进一步对黑沙蒿茎枝内生细菌、真菌进行 LDA 分析(LDA>3.3)发现,黑沙蒿成熟枝并未出现显著差异的细菌菌属,嫩枝具有更多的显著差异菌属,如 γ -变形杆菌属(*Gammaproteobacteria*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、罗尔斯顿菌属(*Ralstonia*)

等(图 5A)。内生真菌中,黑沙蒿成熟枝的差异菌属多于嫩枝,主要是 *Ascomycota* (p)、*Orbiliaceae* (f)和 *Pneumocystidaceae* (f)等,嫩枝中则主要是 *Aureobasidiaceae* (f)、*Dothideales* (o)和 *Aureobasidium* (g)等(图 5B)。

2.4 黑沙蒿茎枝内生细菌、真菌功能预测

通过 PICRUSt (level 3)和 FUNGuild 对黑沙蒿茎枝内生菌群落进行功能预测分析。结果显示,黑沙蒿嫩枝和成熟枝内生细菌功能无显著差异,大部分集中于蛋白转运(transporters、ABC transporters),光合作用(photosynthesis proteins、photosynthesis、porphyrin and chlorophyll metabolism),代谢(purine metabolism、arginine and proline metabolism、pyrimidine metabolism、amino sugar and nucleotide sugar metabolism)等方面(图 6A)。

2.5 黑沙蒿茎枝木质化程度与菌属相关性

图 7 可见,黑沙蒿成熟枝与嫩枝相比,同纤维素、半纤维素、果胶相关的细菌菌数更多;

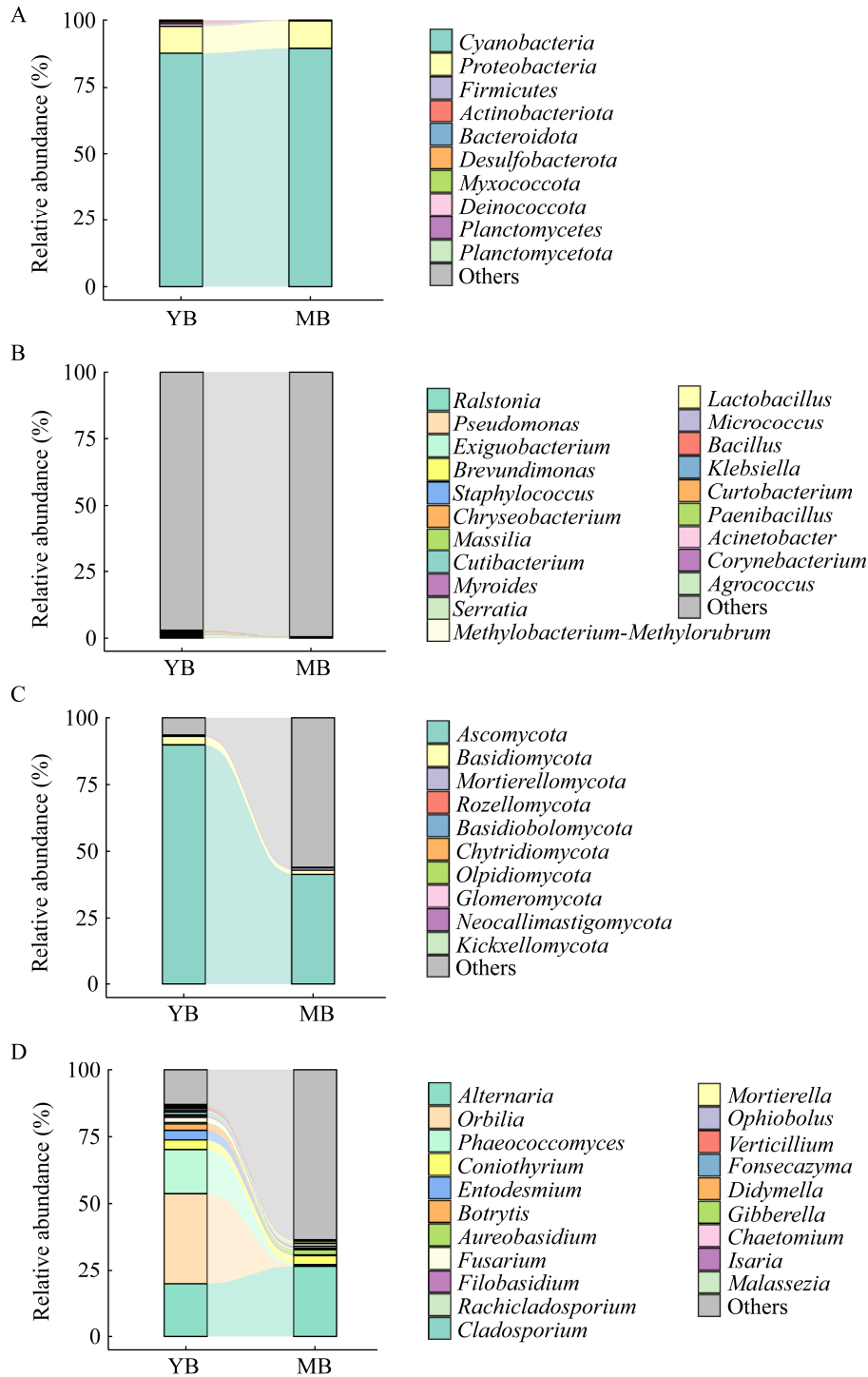


图 4 黑沙蒿茎枝内生细菌和真菌群落组成 A: 内生细菌门水平上的群落组成; B: 内生细菌属水平上的群落组成; C: 内生真菌门水平上的群落组成; D: 内生真菌属水平上的群落组成

Figure 4 Community composition of endophytic bacteria and fungi of *A. ordosica*. A: Community composition at the phylum level of endophytic bacteria; B: Genus level of endophytic bacteria; C: Community composition at the phylum level of endophytic fungi; D: Genus level of endophytic fungi.

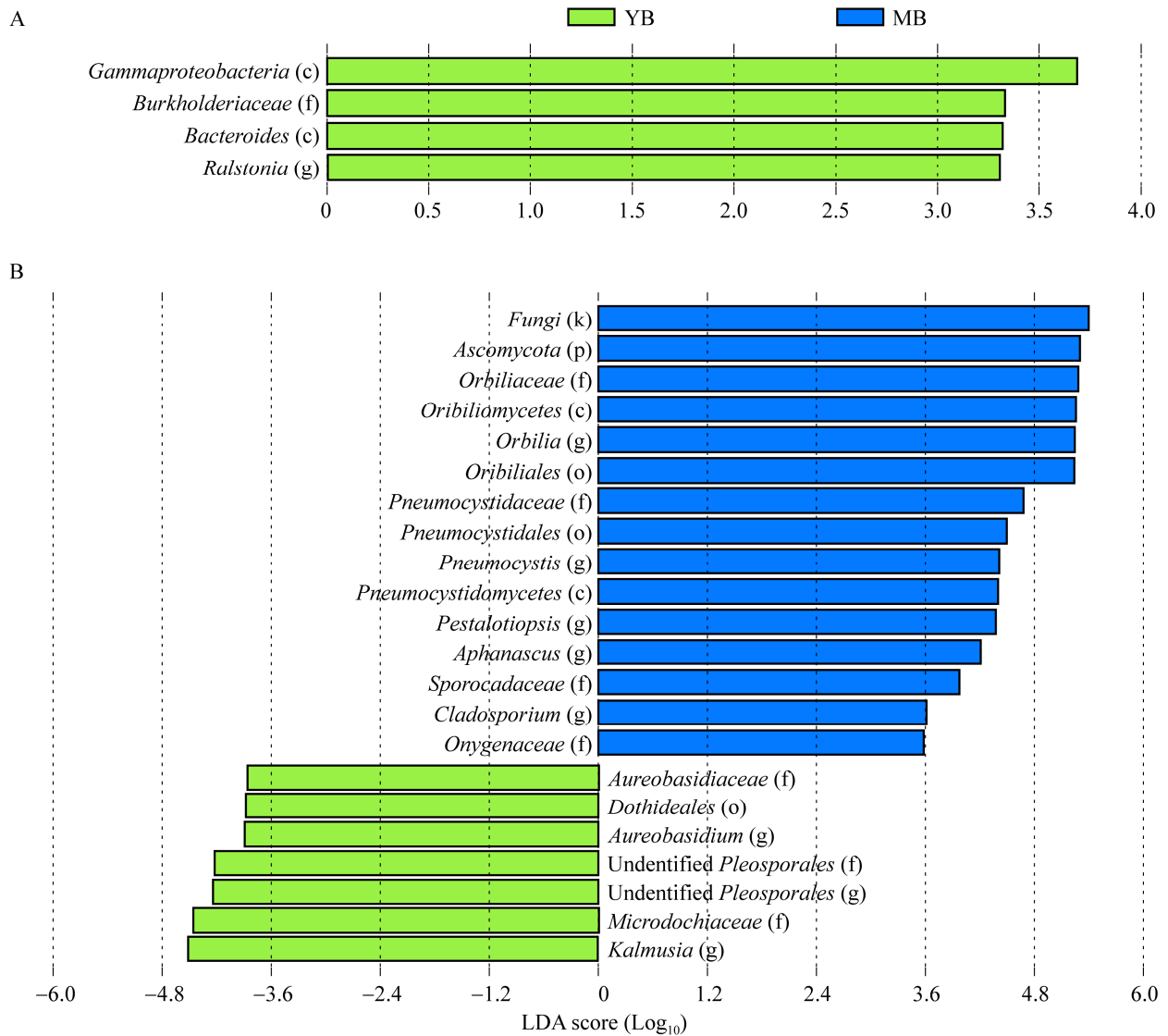


图 5 黑沙蒿茎枝内生细菌(A)和真菌(B) LDA 分析

Figure 5 LDA analysis on the endophytic bacteria (A) and fungi (B) of *A. ordosica*.

同时, 茎枝内生细菌菌属与纤维素、果胶大多呈现负相关, 其中嫩枝中的 *Klebsiella* 及成熟枝中的 *Ralstonia*、*Staphylococcus*、*Nocardioidea* 和 *Pedomicrobium* 呈现显著负相关。内生真菌中, 纤维素与嫩枝和成熟枝均为负相关关系, 例如嫩枝中的 *Entodesmium* 和 *Coniothyrium* 等菌属及成熟枝中的 *Filobasidium* 和 *Cladosporium* 等菌属。

3 讨论与结论

高等植物在遭受干旱胁迫时会通过生理变化以适应逆境^[31-32]。例如, 干旱胁迫会导致植物细胞壁厚度下降, 降低碳分配效率影响细胞壁的形成, 并阻碍水分和营养物质的输送^[33]。在我们的研究中, 黑沙蒿作为抗逆性极强的灌木, 通过积累木质素、加速茎枝木质化进程以

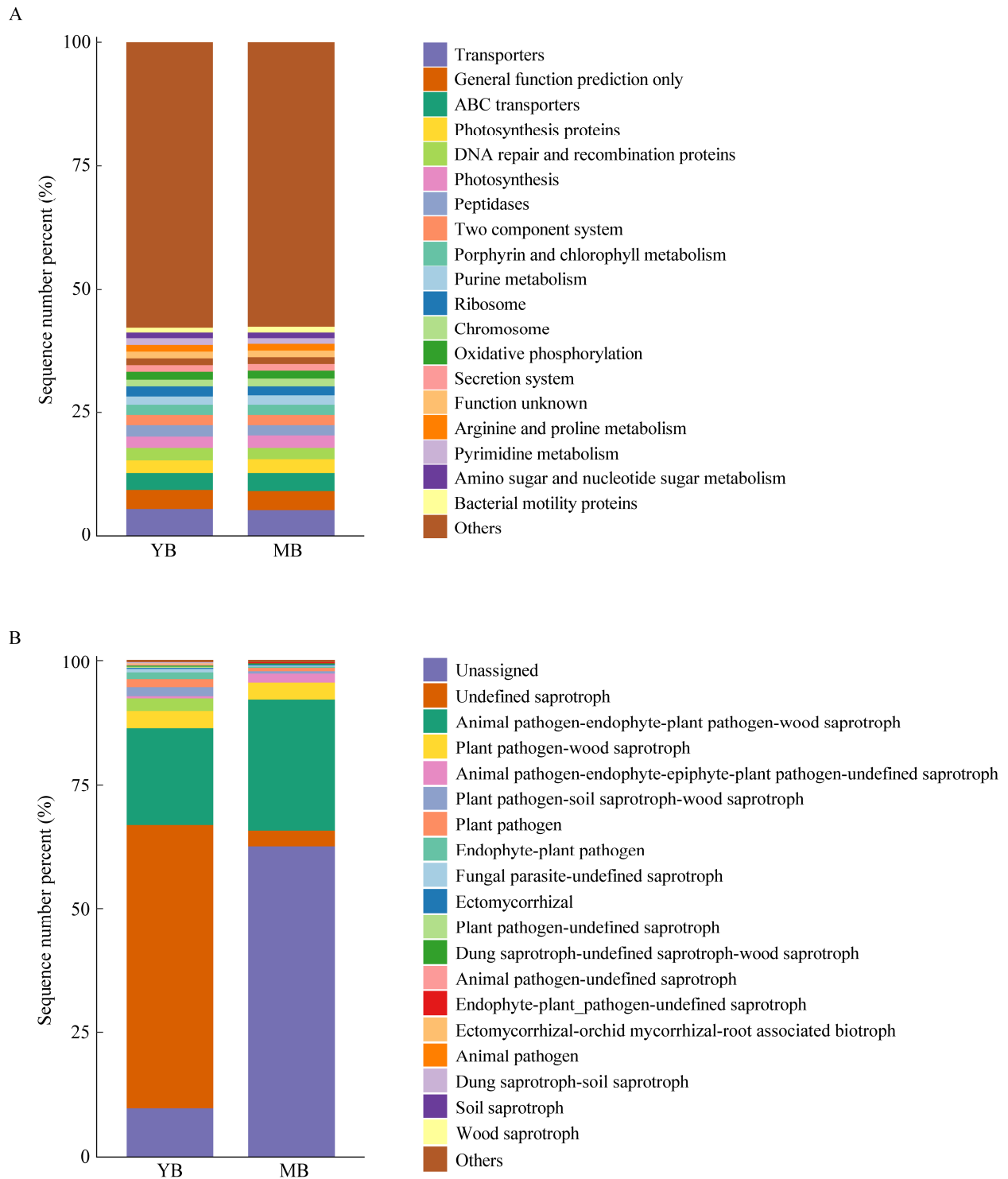


图 6 黑沙蒿茎枝内生细菌(A)和真菌(B)功能预测

Figure 6 Functional prediction analysis on the endophytic bacteria (A) and fungi (B) of *A. ordosica*.

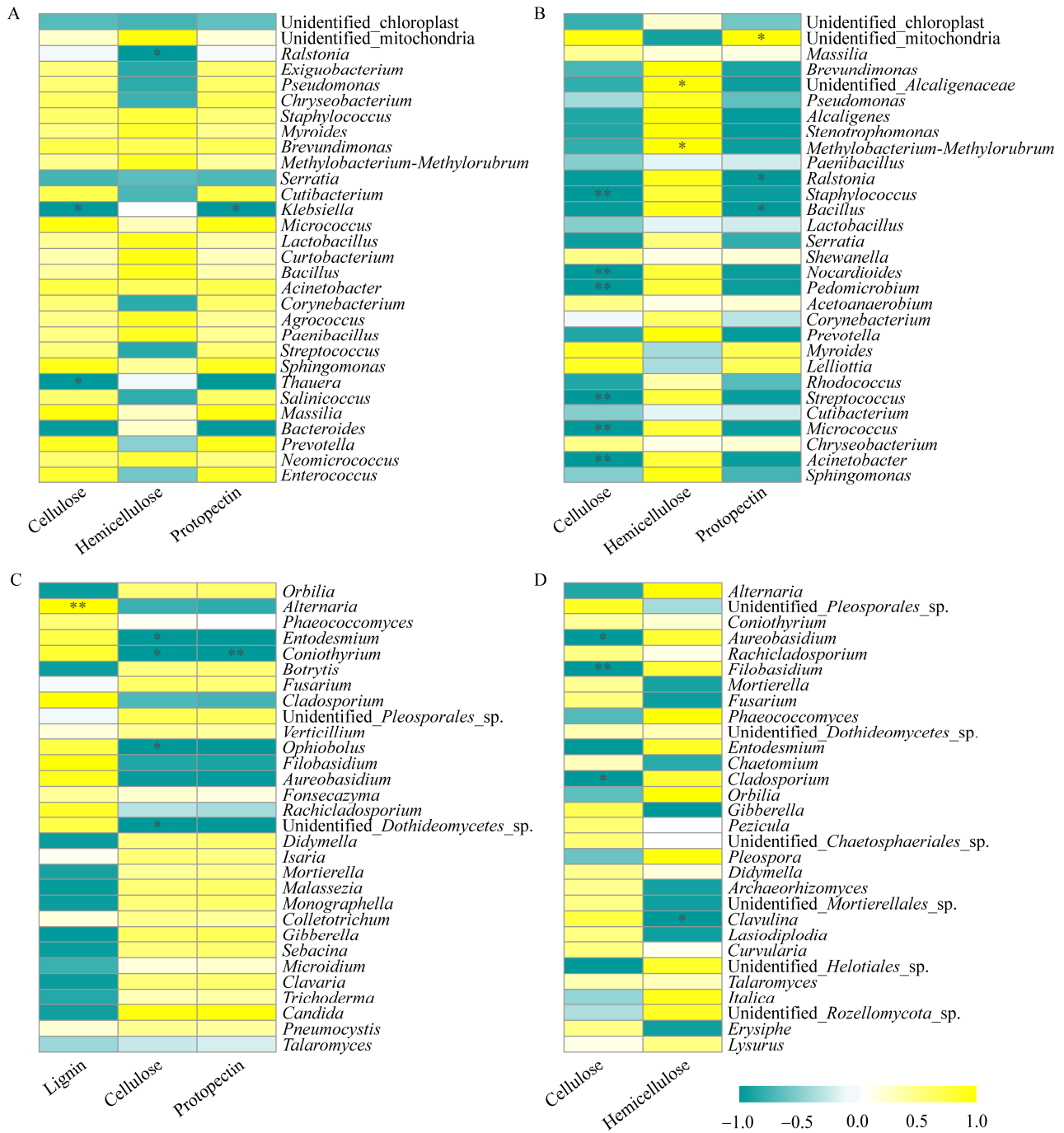


图 7 黑沙蒿茎枝内生细菌和真菌与木质化指标相关性分析 A: 嫩枝内生细菌与木质化指标相关性分析; B: 成熟枝内生细菌与木质化指标相关性分析; C: 嫩枝内生真菌与木质化指标相关性分析; D: 成熟枝内生真菌与木质化指标相关性分析

Figure 7 Correlation analysis on the endophytic bacteria and fungi with lignification index of *A. ordosica*. A: Correlation analysis on the endophytic bacteria with lignification index of young branches; B: Endophytic bacteria with lignification index of mature branches; C: Endophytic fungi with lignification index of young branches; D: Endophytic bacteria with lignification index of mature branches.

适应逆境。Bray^[33]指出水分亏缺会影响植物纤维素的生物合成, 我们研究发现, 黑沙蒿成熟枝中纤维素含量显著高于嫩枝, 一方面是成熟枝木质化维持了细胞壁结构的完整性, 维持细胞膨压以此提高细胞在低水势条件下的发育^[34-35]; 另一方面, 在增强细胞壁厚度的同时, 能有效保护植株营养物质从源(根系)到库(嫩枝)的运输^[36]。果胶在调节植物细胞壁结构应对干旱胁迫中同样发挥着重要作用^[37-38]。以往研究指出, 植物在遭受水分胁迫时, 果胶降解酶的活性会下调表达, 降低细胞壁中果胶的含量^[34,39]。我们研究中黑沙蒿成熟枝和嫩枝中果胶含量无明显差异, 可以推测成熟枝木质化的进程提高了植物对逆境的适应能力。

植物微生物组通过提高植物生物和非生物胁迫的耐受性及影响植物功能性状来平衡植物的生态系统^[40-41]。Yu 等^[14]指出, 植物在生长发育阶段内生菌群落 OTU 是共享的, 但一些罕见的和高度多样化的 OTU 表明植物不同生长阶段的特异性, 本研究发现黑沙蒿嫩枝的细菌和真菌 OTU 均高于成熟枝, 这表明植物茎枝在发育阶段具有更高的内生菌群落多样性。此外, Ambika Manirajan 等^[42]研究证实, 植物组织间的内生菌多样性和共享菌群比例的差异可能与内生菌的环境差异及不同生态位的定殖能力有关, 黑沙蒿嫩枝和成熟枝间内生菌群落结构的差异说明微生物群落的显著变化与植物的生长发育密切相关。

植物内生菌菌群能有效促进植物的生长, 如直接促使植物生长素、细胞分裂素和赤霉素等生长激素、调节激素的产生^[43-44]; 或是间接通过固氮、溶磷等生化过程提高植物对养分的吸收^[44]。本研究中, 黑沙蒿嫩枝具有较高的 *Gammaproteobacteria*、*Bacteroidota*、*Bacillus* 和 *Pseudomonadales* 占比, 这些菌群可以分泌

1-氨基环丙烷-1-羧酸酯(1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, ACC)脱氨酶, 降低乙烯(逆境激素)的水平, 从而通过提高植物的抗逆性来间接促进植物的生长^[45]。此外, 上述菌群还可以通过产生抗生素、抑制病原体挥发性化合物、诱导植物系统抗性增强植物对病原菌感染的抗性^[46-48]。可见, 黑沙蒿茎枝在生长发育时, 内生菌菌群的相互作用是其适应逆境的关键因素。

黑沙蒿嫩枝与成熟枝内生菌群落结构差异还受茎枝组织在环境中暴露时间长短的影响, 成熟枝通常较嫩枝面临更多的环境压力, 例如光照、辐射、气温变化、草食性动物侵害等^[48]。本研究中, 茎枝内生真菌的差异更能体现这一特征, 嫩枝中 *Orbilia* 菌属的占比高于成熟枝, 而 *Orbilia* 菌属与昆虫取食存在相互关系^[49], 这或许是因为木质化提高了成熟枝抵御昆虫侵害的能力^[50]。此外, Moreno-Rico 等研究指出, *Phaeococcomyces* 属于病原菌, 其在植物上的定殖加速了植株叶片的枯萎和凋落^[51]。我们研究发现, 黑沙蒿成熟枝中 *Phaeococcomyces* 菌属的相对占比明显下降, 这或许是在黑沙蒿发育过程中 *Phaeococcomyces* 菌属不能适应成熟枝的生理特性, 从而导致了其菌属的相对占比下降。已有学者指出, *Alternaria* 菌属的生物多样性和生物活性可作为识别寄主和生物地理学的特征菌属^[52], 本研究中黑沙蒿成熟枝中 *Alternaria* 菌属的占比高于嫩枝, 或可将该菌属作为黑沙蒿或是植物发育阶段的特征菌属。值得注意的是, *Microdochiaceae* 和 *Kalmusia* 属于病原菌, 黑沙蒿嫩枝中这 2 种菌属具有较高占比, 这或许是黑沙蒿嫩枝木质化程度较低、易受病原菌的侵害所致^[53-56]。内生真菌功能预测中存在较大的变化, 例如未识别的腐生生物在嫩枝中具有较大占比, 随着茎枝的发育, 动植

物病原体及木质腐生生物在成熟枝中呈现上升趋势,表明在黑沙蒿茎枝发育中,内生真菌可能发挥着更多的作用。

在土壤-植物连续体中,微生物群落受气候、土壤和营养物质输入等多种宿主和环境因素的交互影响,微生物群落随植物发育阶段的聚集机制仍然缺乏全面的认识^[26]。尽管现在的研究更多地关注植物不同组织间内生菌群落的差异,但我们通过高通量测序对黑沙蒿嫩枝和成熟枝内生菌群落差异分析发现,嫩枝具有更多的 OTU,聚集了较多的细菌、真菌群落,成熟枝则具有较高的环境适应能力。本研究为今后植物内生菌群响应逆境胁迫、自然衰老、病原菌侵害等方面提供一定的科学依据,在之后的工作中应结合植物根际生境、植物组织内生菌群落变化进行全面分析;同时,适当扩大研究范围,对空间尺度下植物内生菌群落的环境响应作出细致解析。

REFERENCES

- [1] Shaik R, Ramakrishna W. Machine learning approaches distinguish multiple stress conditions using stress-responsive genes and identify candidate genes for broad resistance in rice[J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(1): 481-495
- [2] Anjum SA, Xie XY, Wang LC, Saleem MF, Man C, Lei W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress[J]. *African Journal of Agricultural Research*, 2011, 6(9): 2026-2032
- [3] Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: diversity and functional roles[J]. *New Phytologist*, 2009, 182(2): 314-330
- [4] Hawkes CV, Connor EW. Translating phytobiomes from theory to practice: ecological and evolutionary considerations[J]. *Phytobiomes Journal*, 2017, 1(2): 57-69
- [5] Giaque H, Connor EW, Hawkes CV. Endophyte traits relevant to stress tolerance, resource use and habitat of origin predict effects on host plants[J]. *The New Phytologist*, 2019, 221(4): 2239-2249
- [6] 赵倩倩, 王敏敏, 罗成, 秦敬嘉, 李亚荣, 田露. 碱蓬内生菌 PTL-1 的分离鉴定及其次生代谢产物[J]. *陕西科技大学学报*, 2021, 39(3): 48-53
- [7] Zhao QQ, Wang MM, Luo C, Qin JJ, Li YR, Tian L. Isolation and identification of endophyte PTL-1 from *Suaeda salsa* and its secondary metabolites[J]. *Journal of Shaanxi University of Science & Technology*, 2021, 39(3): 48-53 (in Chinese)
- [8] Hanna AL, Youssef HH, Amer WM, Monib M, Fayed M, Hegazi NA. Diversity of bacteria nesting the plant cover of north Sinai deserts, Egypt[J]. *Journal of Advanced Research*, 2013, 4(1): 13-26
- [9] 许国琪, 刘怡莹, 曹鹏熙, 刘星. 青藏高原冰川棘豆 (*Oxytropis glacialis*) 内生菌核心微生物组的界定及其互作网络分析[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(9): 2746-2758
- [10] Xu GQ, Liu YX, Cao PX, Liu X. Core microflora and endophytic interaction network of *Oxytropis glacialis* in Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(9): 2746-2758 (in Chinese)
- [11] Papik J, Folkmanova M, Polivkova-Majorova M, Suman J, Uhlik O. The invisible life inside plants: deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 44: 107614
- [12] Hardoim PR, Van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 79(3): 293-320
- [13] Sanjay A, Purvi NP, Meghna JV, G Rao G. Isolation and characterization of endophytic bacteria colonizing halophyte and other salt tolerant plant species from coastal Gujarat[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2014, 8(17): 1779-1788
- [14] 顾美英, 古丽尼沙·沙依木, 张志东, 朱静, 刘晓静, 唐琦勇, 欧提库尔·玛合水提, 宋素琴, 冯雷, 唐光木, 等. 黑果枸杞不同组织内生细菌群落多样性[J]. *微生物学报*, 2021, 61(1): 152-166
- [15] Gu MY, Gulinisha·SYM, Zhang ZD, Zhu J, Liu XJ, Tang QY, Outikuer·Mahmut, Song SQ, Feng L, Tang GM, et al. Diversity and function analysis of endophytic bacterial community in different tissues of *Lycium ruthenicum* Murr[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(1): 152-166 (in Chinese)
- [16] Van Velzen R, Holmer R, Bu FJ, Rutten L, Van Zeijl A, Liu W, Santuari L, Cao QQ, Sharma T, Shen DF, et al. Comparative genomics of the nonlegume *Parasponia* reveals insights into evolution of nitrogen-fixing *Rhizobium* symbioses[J]. *PNAS*, 2018, 115(20): 10761-10766

- E4700-E4709
- [14] Yu XJ, Yang JS, Wang ET, Li BZ, Yuan HL. Effects of growth stage and fulvic acid on the diversity and dynamics of endophytic bacterial community in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 867
- [15] 郭宾会. 植物内生菌的生态学作用与天然产物研究现状及展望[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(20): 13-19
- Guo BH. Current status and prospects of ecological roles and natural products of endophytes in plants[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(20): 13-19 (in Chinese)
- [16] Grönemeyer JL, Burbano CS, Hurek T, Reinhold-Hurek B. Isolation and characterization of root-associated bacteria from agricultural crops in the Kavango region of Namibia[J]. *Plant and Soil*, 2012, 356(1/2): 67-82
- [17] Nelson MS, Sadowsky MJ. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 491
- [18] 许国琪, 刘怡萱, 曹鹏熙, 姬亚丽, 李敬科, 李小燕, 刘星. 基于 Illumina MiSeq 测序技术对冰川棘豆 (*Oxytropis glacialis*) 不同组织内生菌多样性的研究[J]. *生态学报*, 2021, 41(12): 4993-5003
- Xu GQ, Liu YX, Cao PX, Ji YL, Li JK, Li XY, Liu X. Endophytes diversity of *Oxytropis glacialis* at different tissues based on Illumina MiSeq sequencing[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2021, 41(12): 4993-5003 (in Chinese)
- [19] Siciliano SD, Fortin N, Mihoc A, Wisse G, Labelle S, Beaumier D, Ouellette D, Roy R, Whyte LG, Banks MK, et al. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2469-2475
- [20] Yandigeri MS, Meena KK, Singh D, Malviya N, Singh DP, Solanki MK, Yadav AK, Arora DK. Drought-tolerant endophytic actinobacteria promote growth of wheat (*Triticum aestivum*) under water stress conditions[J]. *Plant Growth Regulation*, 2012, 68(3): 411-420
- [21] Kogel KH, Franken P, Hüchelhoven R. Endophyte or parasite: what decides?[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(4): 358-363
- [22] Fitzpatrick CR, Salas-González I, Conway JM, Finkel OM, Gilbert S, Russ D, Teixeira PJL, Dangl JL. The plant microbiome: from ecology to reductionism and beyond[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2020, 74: 81-100
- [23] Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, Sa TM, Singh BK. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(11): 607-621
- [24] Sessitsch A, Pfaffenbichler N, Mitter B. Microbiome applications from lab to field: facing complexity[J]. *Trends in Plant Science*, 2019, 24(3): 194-198
- [25] Marques JM, Da Silva TF, Vollú RE, De Lacerda JRM, Blank AF, Smalla K, Seldin L. Bacterial endophytes of sweet potato tuberous roots affected by the plant genotype and growth stage[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 96: 273-281
- [26] Xiong C, Singh BK, He JZ, Han YL, Li PP, Wan LH, Meng GZ, Liu SY, Wang JT, Wu CF, et al. Plant developmental stage drives the differentiation in ecological role of the maize microbiome[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 171
- [27] Robinson RJ, Fraaije BA, Clark IM, Jackson RW, Hirsch PR, Mauchline TH. Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability[J]. *Plant and Soil*, 2016, 405(1/2): 381-396
- [28] Goulart MC, Cueva-Yesquén LG, Hidalgo Martinez KJ, Attili-Angelis D, Fantinatti-Garbozzini F. Comparison of specific endophytic bacterial communities in different developmental stages of *Passiflora incarnata* using culture-dependent and culture-independent analysis[J]. *MicrobiologyOpen*, 2019, 8(10): e896
- [29] Kobayashi T, Liao RT, Li SQ. Ecophysiological behavior of *Artemisia ordosica* on the process of sand dune fixation[J]. *Ecological Research*, 1995, 10(3): 339-349
- [30] Bai YX, She WW, Michalet R, Zheng J, Qin SG, Zhang YQ. Benefactor facilitation and beneficiary feedback effects drive shrub-dominated community succession in a semi-arid dune ecosystem[J]. *Applied Vegetation Science*, 2018, 21(4): 595-606
- [31] Lisar SYS, Motafakkerzad R, Mosharraf M, Rahm IMM. Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses[M]. *Water Stress*, 2012: 1-14
- [32] Balducci L, Deslauriers A, Giovannelli A, Beaulieu M, Delzon S, Rossi S, Rathgeber CBK. How do drought and warming influence survival and wood traits of *Picea mariana* saplings?[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(1): 377-389
- [33] Bray EA. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(407): 2331-2341

- [34] Ricardi MM, González RM, Zhong SL, Domínguez PG, Duffy T, Turjanski PG, Salgado Salter JD, Alleva K, Carrari F, Giovannoni JJ, et al. Genome-wide data (ChIP-seq) enabled identification of cell wall-related and aquaporin genes as targets of tomato ASR1, a drought stress-responsive transcription factor[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 29
- [35] Cho SK, Kim JE, Park JA, Eom TJ, Kim WT. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper CaXTH3, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(13): 3136-3144
- [36] Wolf S, Greiner S. Growth control by cell wall pectins[J]. *Protoplasma*, 2012, 249(Suppl 2): S169-S175
- [37] Peaucelle A, Braybrook S, Höfte H. Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: 121
- [38] Pandey A, Rajamani U, Verma J, Subba P, Chakraborty N, Datta A, Chakraborty S, Chakraborty N. Identification of extracellular matrix proteins of rice (*Oryza sativa* L.) involved in dehydration-responsive network: a proteomic approach[J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(7): 3443-3464
- [39] Pérez-Jaramillo JE, Carrión VJ, De Hollander M, Raaijmakers JM. The wild side of plant microbiomes[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 143
- [40] Berg G, Grube M, Schlöter M, Smalla K. The plant microbiome and its importance for plant and human health[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 491
- [41] Fitzpatrick CR, Copeland J, Wang PW, Guttman DS, Kotanen PM, Johnson MTJ. Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species[J]. *PNAS*, 2018, 115(6): E1157-E1165
- [42] Ambika Manirajan B, Ratering S, Rusch V, Schwirtz A, Geissler-Plaum R, Cardinale M, Schnell S. Bacterial microbiota associated with flower pollen is influenced by pollination type, and shows a high degree of diversity and species-specificity[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(12): 5161-5174
- [43] Compant S, Samad A, Faist H, Sessitsch A. A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application[J]. *Journal of Advanced Research*, 2019, 19: 29-37
- [44] Rascovan N, Carbonetto B, Perrig D, Díaz M, Canciani W, Abalo M, Alloati J, González-Anta G, Vazquez MP. Integrated analysis of root microbiomes of soybean and wheat from agricultural fields[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28084
- [45] Hopkins SR, Wojdak JM, Belden LK. Defensive symbionts mediate host-parasite interactions at multiple scales[J]. *Trends in Parasitology*, 2017, 33(1): 53-64
- [46] Berg M, Koskella B. Nutrient- and dose-dependent microbiome-mediated protection against a plant pathogen[J]. *Current Biology*, 2018, 28(15): 2487-2492
- [47] De Vrieze M, Germanier F, Vuille N, Weisskopf L. Combining different potato-associated *Pseudomonas* strains for improved biocontrol of *Phytophthora infestans*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2573
- [48] Arnold AE, Herre EA. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (*Malvaceae*)[J]. *Mycologia*, 2003, 95(3): 388-398
- [49] Baral HO, Weber E, Gams W, Hagedorn G, Liu B, Liu XZ, Marson G, Marvanová L, Stadler M, Weiß M. Generic names in the *Orbiliaceae* (*Orbiliomycetes*) and recommendations on which names should be protected or suppressed[J]. *Mycological Progress*, 2018, 17(1/2): 5-31
- [50] Boudet AM, Kajita S, Grima-Pettenati J, Goffner D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses[J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8(12): 576-581
- [51] Moreno-Rico O, Groenewald JZ, Crous PW. Foliicolous fungi from *Arctostaphylos pungens* in Mexico[J]. *IMA Fungus*, 2014, 5(1): 7-15
- [52] Soltani J, Hosseini Moghaddam MS. Antiproliferative, antifungal, and antibacterial activities of endophytic *Alternaria* species from *Cupressaceae*[J]. *Current Microbiology*, 2014, 69(3): 349-356
- [53] Al-Lami HFD, You MP, Barbetti MJ. Incidence, pathogenicity and diversity of *Alternaria* spp. associated with *Alternaria* leaf spot of canola (*Brassica napus*) in Australia[J]. *Plant Pathology*, 2019, 68(3): 492-503
- [54] Abed-Ashtiani F, Narmani A, Arzanlou M. Analysis of *Kalmusia variispora* associated with grapevine decline in Iran[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2019, 154(3): 787-799
- [55] Liang JM, Li GS, Zhao MQ, Cai L. A new leaf blight disease of turfgrasses caused by *Microdochium poae* sp. nov.[J]. *Mycologia*, 2019, 111(2): 265-273
- [56] Kozyrovska NO. Crosstalk between endophytes and a plant host within information-processing networks[J]. *Biopolymers and Cell*, 2013, 29(3): 234-243