

DOI: 10. 11766/trxb201302060073

水稻根系内生细菌对未来大气 CO₂ 浓度升高的响应*

任改弟^{1,2} 张华勇¹ 林先贵¹ 朱建国¹ 贾仲君^{1†}

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

(2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 针对中国 FACE (Free Air CO₂ Enrichment) 平台的镇粳 96、扬稻 8 号、II 优 084 和扬两优 6 号四种水稻品种, 采用新一代高通量测序技术, 研究了水稻根系内生菌的整体微生物群落对未来大气 CO₂ 浓度升高的响应。结果表明, 水稻内生菌群落中 γ -变形菌纲的肠杆菌科相对丰度最高, 占整体微生物群落的 30.8% ~ 59.8%。对于镇粳 96、扬稻 8 号和 II 优 084 三种水稻品种, 大气 CO₂ 浓度升高可能抑制了数量上占优势的微生物菌群(优势菌群)生长, 而促进了数量上不占优势的微生物菌群(稀少菌群)繁殖。例如, 对于 II 优 084 品种, 相对丰度高于 14.6% 的 4 种水稻内生菌为肠杆菌科、假单胞菌科、黄单胞菌科和气单胞菌科, 大气 CO₂ 浓度升高, 这些优势菌群的相对丰度由 74.8% 降为 67.2%; 相反, 稀少菌群主要由鞘脂杆菌科、丛毛单胞菌科、黄杆菌科及草酸杆菌科组成, 其相对丰度则由 4.13% 增至 16.9%, 其中, 与对照处理相比, 鞘脂杆菌科相对丰度增加比例高达 344 倍, 是大气 CO₂ 浓度升高的最敏感微生物类群。但对于水稻品种扬两优 6 号, 根系内生菌对大气 CO₂ 浓度升高的响应模式与其他三种品种不完全一致。这些研究结果表明, 微生物的相对丰度可能是影响水稻根系内生菌对大气 CO₂ 浓度升高响应的重要因素, 为研究全球变化下整体微生物结构与功能的演变规律提供了一定的依据。

关键词 高通量测序; 微生物群落; 植物内生菌; FACE

中图分类号 Q938.1 **文献标识码** A

植物内生菌是一类生活在植物组织内部、对植物组织不引起明显病害症状的微生物^[1], 这些微生物在植物生长和健康等方面发挥了重要作用。近年来, 植物内生菌因其在固氮^[2-3]、防病^[4]、促生^[5]、强化植物修复污染环境^[6]等方面的优势而受到广泛关注。事实上, 植物组织内部具有丰富的微生物资源。目前已经从甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.)^[7]、玉米 (*Zea mays*)^[8]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[9] 等禾本科农作物中发现了多种具有固氮功能的内生细菌。然而, 由于研究手段的限制, 目前国内外主要集中于特定内生菌对植物的固氮、抗病、促生等作用的研究, 在整体微生物群落水平的研究报道较少。

微生物是地球物质和能量流动的重要引擎, 广

泛参与了多种营养元素的生物地球化学循环。全球气候变化(比如大气 CO₂ 浓度升高)可能对生态系统中微生物驱动的生态过程产生重要影响。然而目前研究大多集中于土壤微生物群落对全球气候变化的响应与适应^[10-11], 全球变化下植物内生菌的响应与适应规律研究较少。水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 是世界上 50% 以上人口的粮食之源。研究水稻根系内生菌的微生物群落结构和组成及其对未来大气 CO₂ 浓度升高的响应是农业可持续发展的重要内容之一。目前已有利用传统的可培养的方法^[2-3, 5, 9]、克隆文库方法^[12]、变性梯度凝胶电泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 方法^[13] 对水稻根系内生菌的功能或多样性进行研究。但这些方法存在信息量小、费时费

* 科技部国际合作专项项目“大气组成变化及其影响与对策研究”(2010DFA22770)和中国科学院应用微生物研究网络项目(KSCX2-EW-G-16)资助

† 通讯作者, E-mail: jia@issas.ac.cn

作者简介: 任改弟(1984—), 女, 博士研究生, 主要从事环境微生物生态学研究。E-mail: gdren@issas.ac.cn

收稿日期: 2013-02-06; 收到修改稿日期: 2013-04-12

力、分辨率低等不足,限制了对水稻内生菌多样性的认识。新一代高通量测序技术为解决上述方法的局限性提供了新的机遇,该技术因信息量大、分辨率高、快速、准确、高效等优点而被越来越多地应用于微生物生态学研究。

未来大气 CO₂ 浓度升高将对农业生态系统产生重要影响。已有研究表明,大气 CO₂ 浓度升高改变了土壤微生物群落组成和结构^[11],而水稻根系内生菌的响应以及不同品种的水稻根系内生菌的整体微生物群落响应模式鲜见报道。本研究依托中国 FACE (Free Air CO₂ Enrichment) 平台,采集对照圈(即对照处理,浓度为当前大气 CO₂ 浓度)和 FACE 圈(即大气 CO₂ 浓度升高处理,其浓度比对照圈高 200 ± 40 μmol mol⁻¹)的四种水稻(包括两个籼稻品种和两个杂交稻品种)根系样品,利用新一代 454 高通量测序技术对水稻根系内生菌的 16S rRNA 基因进行深度测序,旨在揭示水稻根系内生菌的整体微生物群落组成,以及不同水稻品种根系内生菌对未来大气 CO₂ 浓度升高的响应规律。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

中国 FACE 平台位于江苏省扬州市小纪镇(119°42'0''E, 32°35'5''N),建于 2004 年,处于亚热带地区,年降雨量 900 ~ 1 000 mm,年均温度 16℃,日均光照 12.3 MJ m⁻²,年均日照时间超过 2 000 h,无霜期大于 230 d。试验区采用当地典型的单季稻-麦轮作方式,水稻耕种历史大于 50 年,是我国代表性的水稻产区。土壤类型为下位砂姜土。供试土壤基本理化性质如下:pH 6.8,有机碳 18.4 g kg⁻¹,全氮 1.5 g kg⁻¹,全磷 0.63 g kg⁻¹,全钾 14.0 mg kg⁻¹,容重 1.16 g cm⁻³,砂粒(2 ~ 0.02 mm)578 g kg⁻¹,粉粒(0.02 ~ 0.002 mm)285 g kg⁻¹,黏粒(< 0.002 mm)137 g kg⁻¹。土壤详细理化特性已有报道^[14]。

1.2 试验设计

FACE 系统的田间实验区由 6 个对边距为 12.5 m 的八角形实验圈构成,具体设计和布局已有详细报道^[15]。其中对照圈(Ambient 圈)包括 3 个重复,其大气 CO₂ 浓度为当前大气 CO₂ 浓度,即 355 ± 15 μmol mol⁻¹,本处理为对照处理,用 aCO₂ 表示;另 3 个圈为 FACE 圈,其大气 CO₂ 浓度较对照圈高 200 ± 40 μmol mol⁻¹,即大气 CO₂ 浓度升高处理,用

eCO₂ 表示。FACE 圈和对照圈随机分布且在相邻两圈之间设有缓冲区以防止各个圈中大气 CO₂ 浓度相互影响。

水稻根系样品采集于 2010 年 10 月 10 日(水稻成熟期),共采集了四种水稻品种的根系样品。对照处理的根系样品共计 10 个,其中镇粳 96、扬稻 8 号、II 优 084、扬两优 6 号的根系样品重复分别为 3、2、2、3;FACE 处理的根系样品共计 9 个,其中镇粳 96、扬稻 8 号、II 优 084、扬两优 6 号的根系样品重复分别为 2、2、2、3。用冰盒将水稻根系带回实验室后,小心抖落附着在根系的土壤并用去离子水洗涤根系备用。镇粳 96 和扬稻 8 号属于籼稻品种,II 优 084、扬两优 6 号属于杂交稻品种。

1.3 水稻根系内生微生物 DNA 提取

水稻根系内生菌的微生物基因组 DNA 提取参考已报道的方法^[16]并稍作改进。首先将清洗后的新鲜植物根系浸入 pH 8.0 的 TE 缓冲液(1 mol L⁻¹ Tris-HCL, 500 mmol L⁻¹ EDTA)中(根重量:TE 缓冲液体积 = 1:10),以 200 r min⁻¹ 的转速摇床振荡 1 h 使根表(Rhizoplane)微生物与根分离,收集根表微生物菌悬液,如此共收集 4 次,前 3 次收集的根表微生物菌悬液合并。将前 3 次和第 4 次收集到的菌悬液离心沉淀后分别进行 DNA 提取,然后通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取量。本电泳结果表明,前 3 次提取的 DNA 电泳条带亮度远大于第 4 次(图未列出),说明经过 3 次洗脱后绝大部分根表微生物已经从根表释放,将不会对根内微生物 DNA 造成实质性严重污染。

根系经过上述 4 次 TE 缓冲液洗脱后,将根系剪碎研磨至糊状,浸泡在灭菌的 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液中,以 200 r min⁻¹ 的转速摇床振荡 1 h,用玻璃棉对植物悬液进行过滤,收集过滤液(即菌体细胞液)。再将过滤后的植物渣浸泡于磷酸盐缓冲液,经过摇床振荡-玻璃棉过滤后,对菌体细胞进行再次收集。反复共收集 3 次以便最大程度地回收水稻根系内生菌的微生物细胞。3 次收集的细胞悬液合并,离心沉淀并获得微生物菌体后,加入溶解酶裂解微生物细胞,然后加入十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfonate, SDS)和蛋白酶 K 使得 DNA 从核蛋白中游离出来,再加入 5 mol L⁻¹ 的 NaCl 使蛋白沉淀。再经氯仿-异戊醇反复抽提蛋白、异丙醇离心沉淀 DNA 和 70% 冰乙醇洗涤后,最后用 TE 缓冲液对 DNA 进行溶解。将 DNA 保存于 -20℃ 冰箱,备用。

1.4 新一代高通量测序

利用通用引物 (515F-907R) 扩增微生物 16S rRNA 基因的 V4 区域,修饰后的通用引物含有不同的 Tag 标签用以区分不同样品。每对引物中同时包含 Adaptor 和 Key 序列以提高下游测序效率。具体引物组成如下:5'-Adaptor A or B + Key sequence + (Tag) + (Template-specific sequence) - 3'。例如,515F 端的引物组成为 5' - CGTATCGCCTC-CCTCGCGCCA + TCAG + (6 bp tag) + (GTGCCAGC-MGCCGCGG) - 3';907R 端的引物组成为 5' - CTAT-GCGCCTTGCCAGCCCGC + TCAG + (6 bp tag) + (CCGTCAATTCMTTTRAGTTT) - 3'。聚合酶链式反应 (PCR) 体系如下: 0.25 μl 的 TaKaRa Taq HS (5 U μl^{-1}), 5.0 μl 的 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ Plus), 4.0 μl 的 dNTP Mixture (各 2.5 mmol L⁻¹), 1.0 μl 的引物 (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$), 1.0 μl 的 DNA 模板, 37.75 μl 的无菌水, 总反应体系 50 μl 。PCR 扩增的反应条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5.0 min; 32 \times (94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s); 72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。PCR 产物经过切胶纯化、等摩尔数混合后进行高通量测序。

1.5 高通量数据分析

高通量数据分析采用 Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) (<http://qiime.sourceforge.net>)。主要步骤如下: (1) 对原始数据进行质量控制, 过滤掉低质量的 16S rRNA 基因序列。低质量序列的标准为: 序列长度 < 200 bp, 平均质量得

分 < 25, 序列模糊碱基 N > 1, 同聚物中的寡核苷酸个数 > 6; (2) 根据 Tag 标签, 将所有的序列分配至对应的水稻根系样品; (3) 在 97% 的序列相似度将 16S rRNA 基因序列归为不同的 OTUs (Operational taxonomic units, 操作分类单元)^[17]。OTUs 产出后, 统计各个样品含有 OTUs 总量及每个 OTU 的序列条数, 并从每个 OTU 中选取一个代表性序列, 在 80% 的置信度水平采用 RDP Classifier^[18] 对序列进行分类鉴定, 得到每个 OTU 的微生物物种分类学信息。利用 R 软件 Vegan 程序包 (R v. 2.15.0), 采用主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 方法研究微生物群落结构变化。

2 结果

2.1 新一代高通量测序

对四个水稻品种根系内生菌的 16S rRNA 基因序列进行了高通量测序, 结果表明, 删除掉低质量序列后, 所有 19 个样品共得到了 120 193 条高质量的 16S rRNA 基因序列 (表 1), 平均每个样品的序列数为 6 326, 平均序列长度 402 bp, 几乎所有序列均被鉴定为细菌, 仅 1 条序列为古菌。在 97% 的序列相似度水平上, 所有 120 193 条序列可聚类为 9 503 个不同的 OTUs (表 2), 平均每个样品的 OTUs 个数是 1 091。进一步对每个 OTU 中的代表性序列进行分类鉴定, 结果表明 9 503 个不同的 OTUs 可归为

表 1 高通量序列数及其微生物分类水平概述

Table 1 High throughput sequence number and taxonomic classification of endophytic microbes

水稻品种 Rice variety	CO ₂ 处理 CO ₂ treatment	高质量序列数 High quality reads number	序列被鉴定到各个分类水平的百分比 Percentage of the sequence identified at different taxonomic levels (%)				
			门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
			ZX-96	aCO ₂	7 343 ± 1 979	99.8 ± 0.1	98.5 ± 1.1
	eCO ₂	5 000 ± 1 767	99.9 ± 0.1	98.1 ± 0.0	86.7 ± 0.1	85.3 ± 0.1	33.2 ± 10.4
YD-8	aCO ₂	7 101 ± 1 024	99.7 ± 0.1	98.2 ± 0.9	92.2 ± 5.3	90.5 ± 5.9	24.7 ± 23.2
	eCO ₂	7 005 ± 267	99.7 ± 0.1	98.2 ± 0.1	89.0 ± 3.1	87.8 ± 3.2	33.0 ± 2.2
TY-084	aCO ₂	7 654 ± 848	99.8 ± 0.1	98.3 ± 1.0	89.5 ± 4.8	88.4 ± 4.3	29.1 ± 3.6
	eCO ₂	7 633 ± 750	99.8 ± 0.1	98.5 ± 1.2	88.6 ± 1.8	86.5 ± 0.9	35.8 ± 8.2
YLY-6	aCO ₂	4 020 ± 1 782	99.3 ± 0.7	97.8 ± 1.1	90.0 ± 2.3	87.6 ± 4.0	36.3 ± 8.0
	eCO ₂	5 775 ± 680	100 ± 0	98.1 ± 1.2	91.2 ± 2.1	89.5 ± 2.4	44.8 ± 11.9
总计 Total		120 193	99.7	98.1	89.5	87.7	34.5

注: aCO₂ 表示 ambient CO₂ 对照处理; eCO₂ 表示 CO₂ 浓度升高处理。ZX-96 表示水稻品种镇粒 96; YD-8 表示水稻品种扬稻 8 号; TY-084 表示水稻品种 II 优 084; YLY-6 表示水稻品种扬两优 6 号。下同 Note: "aCO₂" and "eCO₂" denote ambient CO₂ and elevated CO₂, respectively. ZX-96, YD-8, TY-084, and YLY-6 denote rice variety of ZhenXian96, YangDao8, IYou084, and YangLiangYou6, respectively. The same below

10 个门(表 2), 18 个纲, 37 个目, 62 个科, 133 个属。在所有 9 503 个 OTUs 中, 高达 8 424 个 OTUs 被鉴定为变形菌门, 占有 OTUs 的比例高达 88.6% (表 2)。其次为拟杆菌门和厚壁菌门, OTUs 数目分别为 617 和 227 (表 2)。在变形菌门的 8 424 个 OTUs 中, 6 039 个 OTUs 属于 γ -变形菌纲, 占变

形菌门 OTUs 总数的 71.7%, 而 α -、 β -和 δ -变形菌纲仅分别占整个变形菌门 OTUs 总数的 5.05%、14.6% 和 0.43% (表 2)。因此, 在门的分类水平上, 变形菌门是最为优势的微生物菌群; 在纲的水平上, γ -变形菌纲是最为优势的微生物菌群。

表 2 样品中检测到的所有门的 OTUs 数量及隶属于变形菌门的 OTUs 数量

Table 2 Number of OTUs in all the phyla and number of OTUs in Proteobacteria detected in samples

门 Phylum	纲 Class	OTUs 数目 OTUs No.	占总 OTUs 的百分比 Percentage of the total OTUs (%)	占变形菌门总 OTUs 的百分比 Percentage of the total OTUs in Proteobacteria (%)
变形菌门 Proteobacteria		8 424	88.6	
	γ -变形菌纲 Gammaproteobacteria	6 039	63.5	71.7
	β -变形菌纲 Betaproteobacteria	1 231	13.0	14.6
	α -变形菌纲 Alphaproteobacteria	425	4.47	5.05
	δ -变形菌纲 Deltaproteobacteria	36	0.38	0.43
	未确定变形菌门 Unclassified-Proteobacteria	693	7.29	8.23
拟杆菌门 Bacteroidetes		617	6.49	
厚壁菌门 Firmicutes		227	2.39	
放线菌门 Actinobacteria		24	0.25	
浮霉菌门 Planctomycetes		11	0.12	
酸杆菌门 Acidobacteria		5	0.05	
疣微菌门 Verrucomicrobia		4	0.04	
绿弯菌门 Chloroflexi		3	0.03	
广古菌门 Euryarchaeota		1	0.01	
螺旋体门 Spirochaetes		1	0.01	
未确定细菌 Unclassified-bacteria		186	1.96	
总计 Total		9 503		

注: OTUs 表示分类操作单元; OTUs 是在 97% 的序列相似水平计算得到的; 门或纲根据 OTUs 的数目降序排列 Note: "OTUs" denotes operational taxonomic units. OTUs are calculated out on the basis of 97% sequence similarity. The Phylum or Class is presented in descending order on the basis of their OTUs numbers

2.2 不同水稻品种根部内生微生物群落组成

高通量数据结果表明, $\geq 87.7\%$ 的 16S rRNA 基因序列能够鉴定到科以上的分类水平, 但是只有 34.5% 的序列能鉴定到属的水平(表 1), 因此, 后续详细分析将在科水平进行。图 1 结果显示, 肠杆菌科是水稻根系内生菌群落的优势微生物, 占细菌总量的 30.8% ~ 59.8%。其次是假单胞菌科、黄单胞菌科和气单胞菌科, 分别占整体微生物群落的 3.40% ~ 27.8%、6.63% ~ 14.5% 和 1.11% ~ 14.6%。鞘脂杆菌科、丛毛单胞菌科、黄杆菌科和草酸杆菌科的相对丰度较低, 而且在各个处理中相对丰度的变异性较大。

2.3 水稻根系内生菌对大气 CO₂ 浓度升高的响应

根据水稻根系内生菌群的相对丰度高低, 综合

考虑微生物菌群对大气 CO₂ 浓度升高的响应模式(正响应或负相应), 将微生物划分为优势菌群和稀少菌群(图 2)。此外, 因为微生物在各个品种中的相对丰度差异较大, 对于每一个水稻根系内生菌群, 优势菌群和稀少菌群判定阈值因品种而异。例如, 对于水稻品种镇粳 96 (ZX-96) 和扬稻 8 号 (YD-8), 相对丰度分别 $> 12.8\%$ 和 $> 12.0\%$ 的微生物菌群被认为是优势菌群, 同时这些根系内生菌相对丰度随大气 CO₂ 浓度升高而降低; 相对丰度小于等于此百分比的微生物菌群被称为稀少菌群, 其相对丰度较低且随 CO₂ 浓度升高而增加(图 2a, 图 2b)。同理, 对于水稻品种 II 优 084 (TY-084), 相对丰度 $> 2.69\%$ 的微生物菌群被认为是优势菌群, 而相对丰度 $\leq 2.69\%$ 的微生物被认为是稀少菌群(图 2c)。

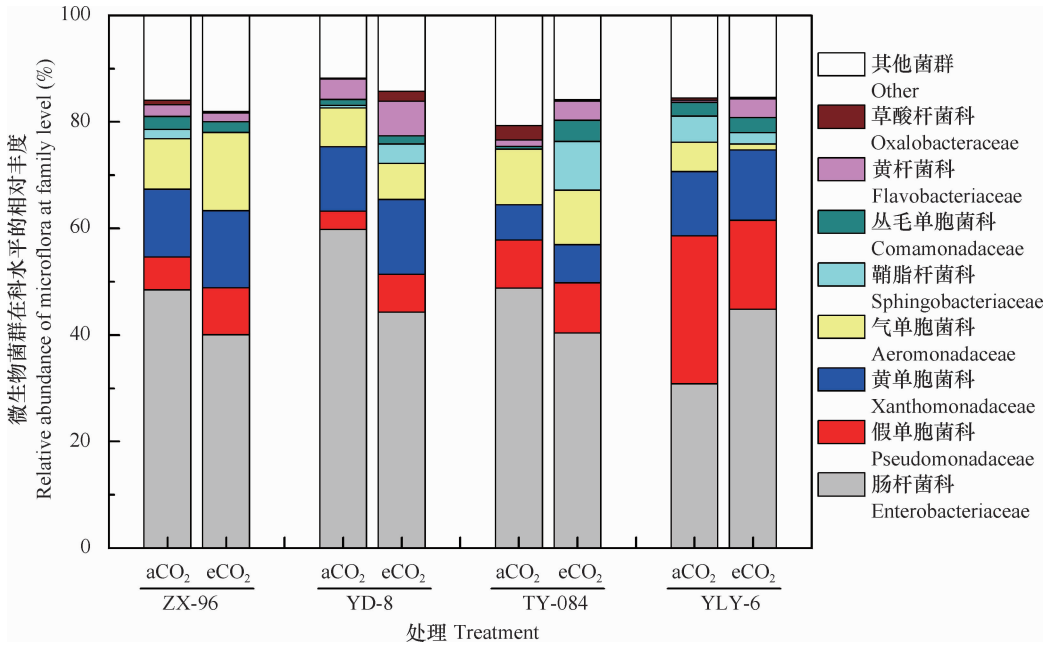


图 1 不同水稻品种根系内生菌群的相对丰度

Fig.1 Relative abundance of endophytic microflora in roots of different rice varieties

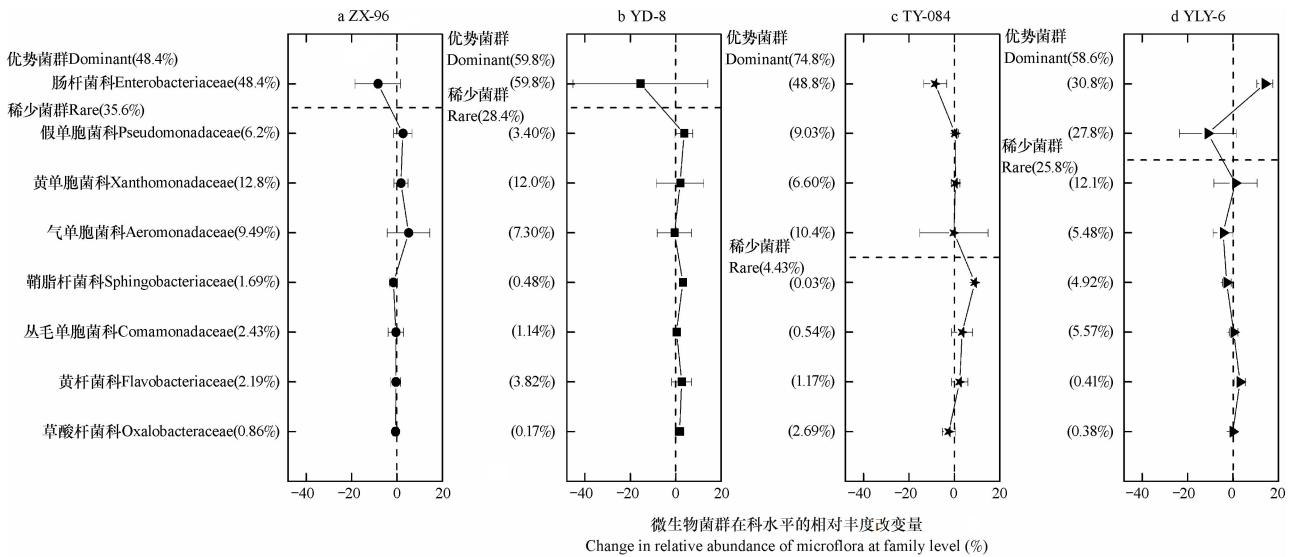


图 2 不同水稻品种微生物菌群的相对丰度变化量

Fig.2 Change in relative abundance of the microflora in rice of different varieties

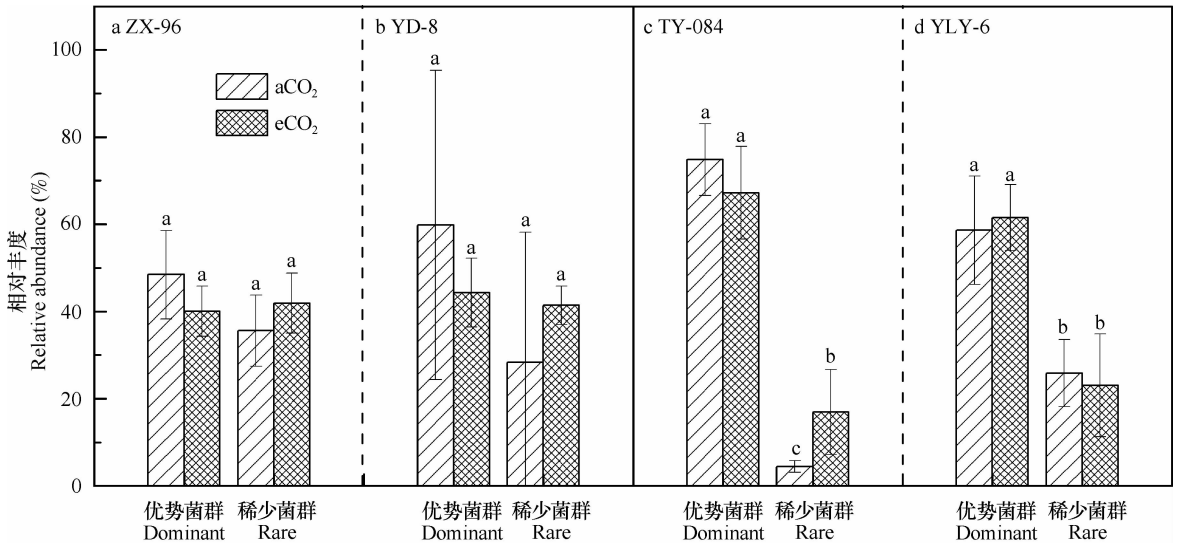
注：“优势菌群”表示相对丰度较高的微生物；“稀少菌群”表示相对丰度较低的微生物；图中横向虚线表示微生物对eCO₂从负响应变为正响应的分界，也是人为划定的优势菌群和稀少菌群的分界。括号内的百分比表示微生物在aCO₂处理中的相对丰度。“优势菌群Dominant (%)”表示相对丰度较高的微生物的相对丰度之和；“稀少菌群Rare (%)”表示相对丰度较低的微生物的相对丰度之和 Note: “Dominant groups” mean the microbial groups high in relative abundance, while “Rare groups” the microbial groups low in relative abundance; The horizontal dotted line represents the boundary line between the negative response and positive response to eCO₂, as well as the boundary artificially set between the dominant and rare microbial groups. The percentage in “()” refers to the relative abundance of the microbes at aCO₂. “Dominant (%)” represents the sum of all the dominant groups in relative abundance, and “Rare (%)” the sum of all the rare groups in relative abundance

对于水稻品种镇粳 96 (ZX-96)、扬稻 8 号 (YD-8) 和 II 优 084 (TY-084), 与对照相比, FACE 圈水稻根系优势菌群的相对丰度较低, 稀少菌群的相对丰度较高 (图 2, 图 3)。例如, 对于品种 II 优 084 (TY-

084), 数量上占优势的微生物菌群 (相对丰度 > 2.69%) 主要包括: 肠杆菌科、假单胞菌科、黄单胞菌科和气单胞菌科 (图 2c)。与对照处理的整体优势菌群相对丰度 74.8% 相比, FACE 处理下相对丰度

降至 67.2% (图 3c)。而稀少菌群 (相对丰度 $\leq 2.69\%$) 主要包括鞘脂杆菌科、丛毛单胞菌科、黄杆菌科和草酸杆菌科 (图 2c), 其相对丰度之和由对照处理的 4.13% 显著增加至 FACE 圈的 16.9% ($p <$

0.05) (图 3c)。对于水稻品种镇粳 96 和扬稻 8 号, 尽管优势菌群仅肠杆菌科一种 (图 2a, 图 2b), 但整体微生物群落对大气 CO_2 浓度升高的响应模式与水稻品种 II 优 084 相似 (图 2c, 图 3c)。



注: 图中优势菌群 (Dominant) 和稀少菌群 (Rare) 相对丰度是将图2中所划分的各个优势菌群和稀少菌群相对丰度分别相加得到的。图中不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$) Note: The relative abundance of the dominant groups and of the rare groups is the sum of the relative abundances of all the individual dominant groups and of all the individual rare groups as is shown in Fig. 2. Different letters in the figure represent significant difference ($p < 0.05$)

图 3 不同水稻品种优势菌群和稀少菌群的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of dominant and rare groups in rice of different varieties

对于水稻品种扬两优 6 号, 其根系内生菌对大气 CO_2 浓度的响应模式与其他品种不完全一致。例如, 大气 CO_2 浓度升高下根系内生菌优势菌群 (肠杆菌科和假单胞菌科) 的相对丰度高于对照处理, 而稀少菌群的相对丰度则低于对照处理。其根系内生菌优势菌群分别为肠杆菌科和假单胞菌科, 在对照圈中相对丰度分别为 30.8% 和 27.8%, 远低于其他三种品种 (镇粳 96、扬稻 8 号和 II 优 084) 的肠杆菌科优势菌相对丰度 (48.4% ~ 59.8%), 表明扬两优 6 号根系内生菌群的结构组成较其他品种更为复杂, 并表现出明显不同的响应模式 (图 2d, 图 3d)。

2.4 大气 CO_2 浓度升高下水稻根系内生菌的敏感微生物菌群

通过比较水稻根系内生菌的相对丰度在 FACE 圈和对照圈是否具有统计上的显著差异 ($p < 0.05$) 以及微生物相对丰度的差异大小确定对大气 CO_2 浓度升高的敏感微生物菌群。结果表明, 鞘脂杆菌科的相对丰度达到了统计上的显著性差异 ($p < 0.05$), 而水稻根系内生菌群的其他微生物均未达

到显著性差异, 鞘脂杆菌科被认为是最为敏感的微生物菌群。对照处理下, 该微生物菌群在扬稻 8 号 (YD-8) 和 II 优 084 (TY-084) 的相对丰度分别为 0.48% 和 0.03%; 而 CO_2 浓度升高处理下分别达到了 3.65% ($p = 0.040$) 和 9.09% ($p = 0.009$) (图 1), 增加倍数分别达到 6.62 倍和 344 倍 (表 3)。此外, 丛毛单胞菌科、黄杆菌科和草酸杆菌科也可能是对大气 CO_2 比较敏感的微生物菌群。尽管大气 CO_2 浓度升高对这三类微生物相对丰度的影响并未达到统计显著性水平 ($p > 0.05$), 但与对照处理相比, FACE 圈中该微生物相对丰度的增加量达到几倍至 10 倍, 表现出明显的增加趋势 (表 3)。

2.5 大气 CO_2 浓度升高对水稻根系内生菌群结构的影响

对各样本序列进行主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 评价大气 CO_2 浓度升高下微生物群落结构的变化规律。结果表明, FACE 圈样品的细菌群落趋向集中于左下象限和右上象限 (图 4 实线圈出部分), 对照圈样品的细菌群落趋向集中于右下象限 (图 4 虚线圈出部分)。尽管 FACE 圈和

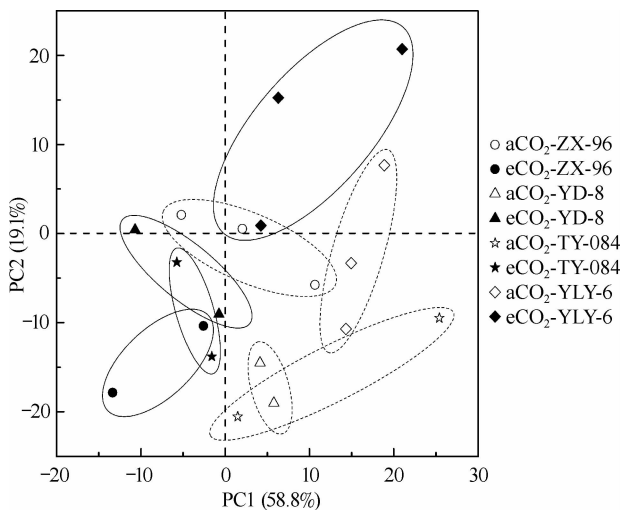
对照圈水稻根系内生菌群落在 PCA 坐标体系的分布有部分重叠,但整体微生物群落分布在坐标体系的不同区域(图 4),表明大气 CO₂ 浓度升高下水稻根系内生菌群落结构发生了一定的变化。

表 3 微生物菌群在科水平上的相对丰度改变倍数

Table 3 Multiple of the change in relative abundance of microflora at family level

微生物菌群 (在科水平) Microflora (at family level)	籼稻		杂交稻	
	Indica variety		Hybrid variety	
	ZX-96	YD-8	TY-084	YLY-6
肠杆菌科 Enterobacteriaceae	-0.17	-0.26	-0.17	0.46
假单胞菌科 Pseudomonadaceae	0.42	1.08	0.05	-0.40
黄单胞菌科 Xanthomonadaceae	0.13	0.16	0.08	0.09
气单胞菌科 Aeromonadaceae	0.54	-0.07	-0.02	-0.80
鞘脂杆菌科 Sphingobacteriaceae	-0.94	6.62	345	-0.56
丛毛单胞菌科 Comamonadaceae	-0.20	0.34	6.37	0.11
黄杆菌科 Flavobacteriaceae	-0.22	0.69	2.03	7.55
草酸杆菌科 Oxalobacteraceae	-0.73	10.1	-0.90	-0.20
其他菌群 Other	0.13	0.21	-0.23	-0.01

注:相对丰度改变倍数 = (微生物菌群在 eCO₂ 处理中的相对丰度 - 微生物菌群在 aCO₂ 的相对丰度) / 微生物在 aCO₂ 的相对丰度
Note: Multiple of the change in relative abundance is calculated as (the relative abundance of the microflora at eCO₂ minus the relative abundance of the microflora at aCO₂) / the relative abundance of the microflora at aCO₂



注:括号里面的数值表示被各个坐标轴解释的百分比 Note: The values in parentheses indicate percentage explained by each ordination axis

图 4 微生物群落的主成分分析

Fig. 4 Principal component analysis (PCA) of microbial communities

3 讨论

植物组织内部具有丰富的微生物资源,深度挖掘这些微生物资源,认知其微生物多样性具有重要意义。对已有的文献进行整合分析,结果表明水稻根系内生菌仅包括约 60 个属的微生物菌群,本研究则发现水稻根系内生菌群在 97% 的序列相似度水平上共计有 9 503 个不同的 OTUs,并可归为 10 个门、18 个纲、37 个目、62 个科、133 个属。传统微生物研究方法的局限性可能是导致这种差异的主要原因。例如,目前几乎所有的水稻根系内生菌研究均采用传统的分离培养法^[2-3, 19-23]、以及分辨率较低的 DGGE^[13]和克隆文库指纹图谱法^[12]。本研究通过新一代 454 高通量测序技术对水稻根系内生菌的整体微生物群落 16S rRNA 基因进行深度测序,所有 19 个样品共得到了 120 193 条高质量序列,平均每个样品的序列数是 6 326,单个样品的检测通量高于常规方法的上百倍。

本实验结果表明,γ-变形菌纲是水稻根组织内部最为优势的微生物菌群,占有微生物 OTUs 总数的百分比高达 71.7% (表 2),这与以前的研究不一致。已有的用克隆文库方法对水稻根系内生菌的研究表明,β-变形菌纲是水稻根系内部最为优势的微生物菌群,占整个克隆文库的 27.1%^[12]。这可能是水稻品种差异、环境条件(如水分含量、营养元素含量)的异质性、研究方法和采样时间的差异性、或者微生物之间的相互作用^[24]所导致的。此外,变形菌门在形态、生理及代谢方面的生物多样性也可能是造成水稻根系内生微生物群落结构差异的重要原因。例如,已有研究表明,变形菌门在碳^[25]、氮^[26]、磷^[27]等元素生物地球化学循环过程中均发挥了重要作用。在微生物分类学科的水平,肠杆菌科是水稻根组织内部最为优势的微生物菌群,其占细菌总数量的 30.8% ~ 59.8% (图 1)。此类微生物菌群可能在满足植物对营养元素的需求方面发挥了重要作用。已有研究表明,肠杆菌科的多个种属具有固氮功能,例如 *Enterobacter cloacae*^[2]、*Klebsiella planticola*^[2]、*Klebsiella pneumoniae*^[19]等,但这些微生物的生理生态功能及其对大气 CO₂ 浓度升高的响应仍需进一步的研究。

不同水稻品种根系内生菌的主要微生物群落组成基本相同,但微生物的相对丰度在不同品种间差异较大。例如,对照处理中,假单胞菌科仅占扬

稻 8 号水稻品种根系内生菌整体微生物群落的 3.40%，而在扬两优 6 号品种中其相对丰度高达 27.8%，几乎相差一个数量级。同样，黄单胞菌科和气单胞菌科在不同水稻品种根系内生菌群落中的相对丰度也有明显差异，分别在 6.63 ~ 14.5% 和 1.11% ~ 14.6% 区间变化。这一现象表明，水稻品种在影响微生物群落结构方面发挥了重要作用，与前人的研究结果具有一致性。例如，Hardoim 等^[13]研究表明水稻品种之间的差异在很大程度上决定了根系内生菌的群落结构，水稻品种越相近其微生物群落组成也越趋向类似，并且品种差异的影响大于土壤类型及养分的利用效率的影响。

大气 CO₂ 浓度升高下，水稻品种镇粳 96、扬稻 8 号和 II 优 084 根系内生菌群落的响应模式基本一致，即大气 CO₂ 升高抑制了根系内生优势菌群的相对丰度，而提高了稀少菌群的相对丰度（图 2，图 3）。这可能是因为大气 CO₂ 浓度升高增加了植物的光合作用，使植物体内积累了更多的碳水化合物，体内 C 素/营养比增大，以 C 素为基础的次生代谢物质（如有机酸、酚类等碳水化合物）就会积累，然后转运到根部^[28]。而对上述碳源（食物源）有“习惯性”依赖的优势微生物菌群生态位发生变化，导致数量减少，而数量上不占优势的微生物菌群极可能占据原有优势物种灭亡后的生态位，表现出种群数量的增加。因此，上述现象可能是微生物与环境条件相互作用的结果，也是环境条件对微生物长期选择的结果。已有研究表明，100 年的荒漠变为农田、樟子松地或杨树林后，数量上占优势的微生物菌群明显减少，而数量上不占优势的微生物的相对丰度明显提高^[29]。

然而，环境干扰下微生物群落的响应规律仍不清楚，极可能与生态系统类型、微生物组成及干扰强度等因素紧密相关。例如，对于水稻品种扬两优 6 号，其根系内生菌的优势菌群对大气 CO₂ 浓度升高的响应模式与其他水稻品种并不完全一致，大气 CO₂ 浓度升高下优势菌群（肠杆菌科和假单胞菌科）的相对丰度增加，而稀少菌群的相对丰度降低（图 2d，图 3d）。这可能与根系内生菌各种微生物的相对丰度有关。例如，对于水稻品种镇粳 96、扬稻 8 号和 II 优 084，其根系内部最优势菌肠杆菌科在对照处理中的相对丰度是 48.4% ~ 59.8%；而对于水稻品种扬两优 6 号，其优势菌群肠杆菌科和假单胞菌科在对照处理中的相对丰度分别是 30.8% 和 27.8%，并且此两类菌群的相对丰度远低于最优

势菌（肠杆菌科）在其他三种水稻品种的相对丰度，表明水稻品种扬两优 6 号优势菌群的单一性远小于其他三种水稻品种，其群落结构更为复杂多样，这可能是导致扬两优 6 号品种根系内生菌对大气 CO₂ 浓度升高响应更为复杂的原因之一。这些结果表明水稻根系内生菌对大气 CO₂ 升高的响应模式极可能与微生物的相对丰度及多样性组成紧密相关。可能存在一个相对丰度阈值，当相对丰度大于此阈值时，微生物表现为正响应；反之，微生物表现为负相应，但其生物学机制仍需进一步研究。

大气 CO₂ 浓度升高改变了水稻根系内生菌的群落结构（图 4），与已有的土壤微生物群落结构研究结果较为一致^[11]。环境微生物群落结构的变化是各种微生物对大气 CO₂ 浓度升高响应不同的综合反映。例如，在水稻品种镇粳 96、扬稻 8 号和 II 优 084 中，大气 CO₂ 浓度升高抑制了优势菌群的相对丰度，而促进稀少菌群的相对丰度，鞘脂杆菌科增幅高达 344 倍（表 4），可能是对 CO₂ 响应最敏感的微生物菌群，而不同微生物菌群相对丰度的改变也最终导致整个微生物群落结构的改变（图 4）。

4 结 论

水稻根系最为优势的内生菌群是 γ -变形菌纲的肠杆菌科，占整体微生物群落比例高达 30.8% ~ 59.8%，大气 CO₂ 浓度升高下水稻品种镇粳 96、扬稻 8 号和 II 优 084 根系的优势菌群相对丰度降低，而稀少菌群相对丰度增加。扬两优 6 号根系内生菌的响应模式与其他三种品种不完全一致，优势菌群（肠杆菌科和假单胞菌科）的相对丰度升高，而稀少菌群的相对丰度降低。微生物的相对丰度可能是影响水稻根系内生细菌对大气 CO₂ 浓度升高响应的重要因素。

致 谢 感谢本课题组严陈、许静、王皖蒙、M. Saiful Alam 同学以及扬州大学周娟博士、赖上坤博士、杨连新教授在样品采集过程中提供的帮助！

参 考 文 献

- [1] Dennis W. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 1995, 73(2): 274—276
- [2] Ladha J K, Barraquio W L, Watanabe I. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 1983, 29(10): 1301—1308

- [3] Muthukumarasamy R, Kang U G, Park K D, et al. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(4): 981—991
- [4] Berg G, Krechel A, Ditz M, et al. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 51(2): 215—229
- [5] Singh R, Mishra R N, Jaiswal H, et al. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from rice (*Oryza sativa* L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis. *Current Microbiology*, 2006, 52(5): 345—349
- [6] 马莹, 骆永明, 滕应, 等. 内生细菌强化重金属污染土壤植物修复研究进展. *土壤学报*, 2013, 50(1): 195—202. Ma Y, Luo Y M, Teng Y, et al. Effects of endophytic bacteria enhancing phytoremediation of heavy metal contaminated soils (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50(1): 195—202
- [7] Dong Z, Canny M J, McCully M E, et al. A Nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. *Plant Physiology*, 1994, 105(4): 1139—1147
- [8] Palus J, Borneman J, Ludden P, et al. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Illis and Doebley. *Plant and Soil*, 1996, 186(1): 135—142
- [9] Barraquio W L, Revilla L, Ladha J K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil*, 1997, 194(1/2): 15—24
- [10] Lipson D, Blair M, Barron-Gafford G, et al. Relationships between microbial community structure and soil processes under elevated atmospheric carbon dioxide. *Microbial Ecology*, 2006, 51(3): 302—314
- [11] He Z L, Piceno Y, Deng Y, et al. The phylogenetic composition and structure of soil microbial communities shifts in response to elevated carbon dioxide. *The ISME Journal*, 2012, 6(2): 259—272
- [12] Sun L, Qiu F B, Zhang X X, et al. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, 2008, 55(3): 415—424
- [13] Hardoim P R, Andreote F D, Reinhold-Hurek B, et al. Rice root-associated bacteria: Insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 77(1): 154—164
- [14] 苑学霞, 林先贵, 褚海燕, 等. 大气 CO₂ 浓度升高对几种土壤微生物学特征的影响. *中国环境科学*, 2006, 26(1): 25—29. Yuan X X, Lin X G, Chu H Y, et al. Influence of atmospheric CO₂ concentration enhancement on soil microbiological properties (In Chinese). *China Environmental Science*, 2006, 26(1): 25—29
- [15] 刘钢, 韩勇, 朱建国, 等. 稻麦轮作 FACE 系统平台 I. 系统结构与控制. *应用生态学报*, 2002, 13(10): 1253—1258. Liu G, Han Y, Zhu J G, et al. Rice-wheat rotational FACE platform I. System structure and control (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(10): 1253—1258
- [16] Garbeva P, van Overbeek L, van Vuurde J, et al. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbial Ecology*, 2001, 41(4): 369—383
- [17] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460—2461
- [18] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Na[?] ve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261—5267
- [19] Engelhard M, Hurek T, Reinhold-Hurek B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environmental Microbiology*, 2000, 2(2): 131—141
- [20] Mano H, Tanaka F, Watanabe A, et al. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes and Environments*, 2006, 21(2): 86—100
- [21] Yanni Y, Rizk R Y, Corich V, et al. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant and Soil*, 1997, 194(1/2): 99—114
- [22] Mano H, Tanaka F, Nakamura C, et al. Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes and Environment*, 2007, 22(2): 175—185
- [23] Singh B K, Bardgett R D, Smith P, et al. Microorganisms and climate change: Terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(11): 779—790
- [24] Hunter P J, Hand P, Pink D, et al. Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca* species) phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(24): 8117—8125
- [25] Badger M R, Bek E J. Multiple Rubisco forms in proteobacteria: Their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(7): 1525—1541
- [26] Galloway J N. The global nitrogen cycle: Changes and consequences. *Environmental Pollution*, 1998, 102(1): 15—24
- [27] Longnecker K, Lomas M W, van Mooy B A S. Abundance and diversity of heterotrophic bacterial cells assimilating phosphate in the subtropical North Atlantic Ocean. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(10): 2773—2782
- [28] 陈改革, 朱建国, 程磊. 高 CO₂ 浓度下根系分泌物的研究进展. *土壤*, 2005, 37(6): 602—606. Chen G P, Zhu J G, Cheng L. A summary of researches on effects of CO₂ elevation on root exudates (In Chinese). *Soils*, 2005, 37(6): 602—606
- [29] Wang B Z, Zhang C X, Liu J L, et al. Microbial community changes along a land-use gradient of desert soil origin. *Pedosphere*, 2012, 22(5): 593—603

RESPONSE OF ENDOPHYTIC BACTERIA IN RICE ROOTS TO ELEVATED CO₂Ren Gaidi^{1,2} Zhang Huayong¹ Lin Xiangui¹ Zhu Jianguo¹ Jia Zhongjun^{1*}*(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)**(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)*

Abstract Using the new high-throughput sequencing technique, study was carried out on responses to elevated CO₂ (eCO₂) of endophytic bacteria at the whole microbial community level in the roots of ZhenXian-96 (ZX-96), YangDao-8 (YD-8), II You-084 (TY-084), and YangLiangYou-6 (YLY-6), commonly used in the FACE experiment in China. Results show that the family of Enterobacteriaceae within the class of γ -proteobacteria was the highest in relative abundance, accounting for 30.8% ~ 59.8% of the whole community. In ZX-96, YD-8, and TY-084, eCO₂ would probably inhibit growth of the microbial groups that are dominant in population (dominant groups) but stimulate growth of those that are less (rare groups). For instance, in rice TY-084, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Xanthomonadaceae, and Aeromonadaceae were the four dominant bacterial groups, of which each exceeded 14.6% in relative abundance, and their total relative abundance declined from 74.8% to 67.2% under eCO₂. On the contrary, the rare groups in the roots, consisting of Sphingobacteriaceae, Comamonadaceae, Flavobacteriaceae, and Oxalobacteraceae, increased from 4.13% to 16.9% in total. Especially the family of Sphingobacteriaceae increased by up to 344 folds, and hence is the microbial group the most sensitive to eCO₂. However, in YLY-6, the responses of endophytic bacteria differed in pattern from those in other varieties of rice. These findings indicate that relative abundance of microbes may probably be an important factor affecting the response of endophytic bacteria in the roots to elevated CO₂, which may be used as certain basis for the study on variation of structure and function of the whole microbial community in response to the global climate change.

Key words High throughput sequencing; Microbial community; Endophytic bacteria; FACE (Free Air CO₂ Enrichment)

(责任编辑:卢 萍)