



•研究报告•

# 热带山地雨林木本豆科和樟科植物叶内生细菌群落：物种与功能群多样性及驱动因子

吴春玲<sup>1</sup>, 罗竹慧<sup>1</sup>, 李意德<sup>2</sup>, 许涵<sup>2</sup>, 陈德祥<sup>2</sup>, 丁琼<sup>1\*</sup>

1. 海南大学海南省农林环境过程与生态调控重点实验室, 海口 570228; 2. 中国林业科学研究院热带林业研究所海南尖峰岭森林生态系统国家野外科学观测研究站, 广州 510520

**摘要:** 揭示热带木本豆科与樟科植物的叶内生细菌群落的物种与代谢功能群组成差异及其驱动因子有助于理解热带森林的植物适应性和生物多样性维持机制。本研究采用Illumina Miseq测序平台检测海南尖峰岭热带山地雨林中豆科与樟科植物叶内生细菌, 并采用FAPROTAX微生物地球化学循环代谢功能数据库注解内生细菌功能。从豆科植物的长脐红豆(*Ormosia balansae*)、软荚红豆(*O. semicastrata*)与樟科植物的厚壳桂(*Cryptocarya chinensis*)、硬壳桂(*C. chingii*)共4种植物检测到叶内生细菌可操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)达1,123个, 隶属于21门36纲51目92科160属, 其中有600个OTUs被鉴定为变形菌门, 72个OTUs为酸杆菌门, 分别占总细菌序列数的57.17%和15.12%; 噬纤维菌目的薄层菌属(*Hymenobacter*)及根瘤菌目的甲基杆菌属(*Methylobacterium*)的细菌物种最丰富, 分别达37和27个OTUs。叶内生细菌物种组成在豆科与樟科植物之间存在显著差异(ANOSIM:  $R = 0.5792$ ,  $P = 0.004$ )。基于群落非参数性检验的环境向量拟合分析(environmental vector fitting, Envfit)结果表明, 对叶内生细菌群落物种组成影响最大的是叶全钾含量(leaf potassium content, LKC)与比叶面积(specific leaf area, SLA)。有明确分类信息且功能已注释的叶内生细菌OTUs占总OTU数的54.63%, 涉及28类代谢功能群, 其中固氮功能群、好氧化能异养功能群、纤维素分解功能群、甲醇氧化功能群、甲烷氧化功能群、尿素分解功能群等6类功能群的相对多度在非豆科的厚壳桂属(*Cryptocarya*)显著高于豆科的红豆属(*Ormosia*)植物。非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)结果表明, 细菌代谢功能群主要受SLA和叶全磷含量(leaf phosphorus content, LPC)影响。尖峰岭热带山地雨林非豆科植物叶内生细菌群落中相对多度较高的碳、氮代谢功能群可能是其对低有效养分的土壤环境的适应性机制之一。

**关键词:** 木本豆科植物; 叶内生细菌; 细菌代谢功能群; 多样性; 热带雨林

吴春玲, 罗竹慧, 李意德, 许涵, 陈德祥, 丁琼 (2023) 热带山地雨林木本豆科和樟科植物叶内生细菌群落: 物种与功能群多样性及驱动因子. 生物多样性, 31, 23146. doi: 10.17520/biods.2023146.

Wu CL, Luo ZH, Li YD, Xu H, Chen DX, Ding Q (2023) Foliar endophytic bacterial communities of woody Fabaceae and Lauraceae plants in tropical mountain rainforests: Understanding species and functional diversity and their driving factors. Biodiversity Science, 31, 23146. doi: 10.17520/biods.2023146.

## Foliar endophytic bacterial communities of woody Fabaceae and Lauraceae plants in tropical mountain rainforests: Understanding species and functional diversity and their driving factors

Chunling Wu<sup>1</sup>, Zhuhui Luo<sup>1</sup>, Yide Li<sup>2</sup>, Han Xu<sup>2</sup>, Dexiang Chen<sup>2</sup>, Qiong Ding<sup>1\*</sup>

1 Key Laboratory of Agro-Forestry Environmental Processes and Ecological Regulation of Hainan Province, Hainan University, Haikou 570228

2 Hainan Jianfengling Forest Ecosystem National Field Science Observation Research Station of Tropical Forest Research Institute, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520

### ABSTRACT

**Aims:** Revealing the differences in species and metabolic functional groups of endophytic bacterial communities

收稿日期: 2023-05-08; 接受日期: 2023-06-30

基金项目: 国家自然科学基金地区基金(31960237)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: dingqiong@hainu.edu.cn

between tropical woody Fabaceae and Lauraceae plants, as well as their driving factors, contributes to understanding the adaptation and biodiversity maintenance mechanisms of tropical forests.

**Method:** In this study, Illumina Miseq sequencing platform was used to detect endophytic bacteria in Fabaceae and Lauraceae plants in the tropical mountain rainforest of Jianfengling in Hainan, and the FAPROTAX microbial geochemical cycle metabolic functional database was used to annotate the endophytic bacterial function.

**Results:** A total of 1,123 operational taxonomic units (OTUs) of endophytic bacteria belonging to 21 phyla, 36 classes, 51 orders, 92 families, and 160 genera were detected from four plant species, including two species (*Ormosia semicastrata*, *O. balansae*) of Fabaceae and two species (*Cryptocarya chinensis*, *C. chingii*) of Lauraceae. Among them, 600 OTUs were Proteobacteria, accounting for 57.17% of the total bacterial sequences, and 72 OTUs were Acidobacteria, accounting for 15.12%. The bacterial species of the Hymenobacter of Cytophagales, and Methylobacterium of Rhizobiales were the most abundant, with 37 and 27 OTUs, respectively. There were significant differences in endophytic bacterial species composition between Fabaceae and Lauraceae plants (ANOSIM:  $R = 0.5792$ ,  $P = 0.004$ ). The results of the environmental vector fitting analysis based on community non-parametric tests showed that the leaf potassium content and specific leaf area had the greatest impact on the species composition of endophytic bacterial communities. Endophytic bacteria with clear classification information, accounting for 54.63% total number of bacterial OTUs, were annotated to 28 metabolic functional groups. Of these functional groups, nitrogen fixation, aerobic chemoheterotrophy, cellulose degradation, methanol oxidation, methane oxidation, and urea degradation showed significantly higher relative abundance in non-legume *Cryptocarya* plants than in legume *Ormosia* plants. The results of non-metric multidimensional scaling analysis showed that bacterial metabolic functional groups were mainly influenced by specific leaf area and leaf phosphorus content.

**Conclusion:** The higher relative abundance of carbon and nitrogen metabolism functional groups in endophytic bacterial communities of non-legume plants in the Jianfengling tropical mountain rainforest may be one of their adaptive mechanisms to low effective nutrient soil environments.

**Key words:** woody legume; foliar endophytic bacteria; functional bacterial community; diversity; tropical rainforest

植物体内普遍含有内生细菌(endophytic bacteria), 它们能活化土壤养分、固氮、产植物激素, 以及增强植物抗病性, 进而促进植物的生长, 提高植物的逆境适应性(Kandasamy & Kathirvel, 2023)。热带地区有机质分解快, 土壤酸化, 氮、磷、钾养分易淋失, 有效养分偏低(Sun et al, 2020; Cunha et al, 2022)。木本豆科植物是热带森林中较为丰富且重要的植物类群(Sprent et al, 2017), 其根部的核心内生细菌群主要是根瘤菌, 它们固定大气中的氮气( $N_2$ )能为植物提供可直接利用的氨气( $NH_3$ ) (Dudeja et al, 2012), 每年每公顷的固氮高达20–60 kg (Houlton et al, 2008; Dudeja et al, 2012), 这一高氮输入还进一步影响植物的碳累积(Batterman et al, 2013)。此外, 热带豆科植物还能通过改变土壤的pH值和碳氮比(C : N), 调节根部微生物群落物种组成, 进而促进土壤中关键的矿质养分释放, 最终满足次级演替中快速生物量积累对营养贫瘠热带土壤中无机营养素的高需求(Batterman et al, 2013; Epihov et al, 2021)。有研究表明, 距离固氮树种的远近会影响非固氮树种根际微生物群落的组成和土壤代谢过程(Luo et al, 2016)。根瘤菌会影响豆科植物叶的矿质元素含量

(Bērtiņš et al, 2021), 这势必会影响叶内生细菌群落物种的组成及功能。植物的叶际是内生细菌生活的主要场所之一(Kembel et al, 2014), 叶内生细菌通过分泌抑菌物质, 限制病原体在叶内生长, 从而提高植物抗病性(Hong et al, 2015); 叶际微生物组中固氮细菌极普遍, 热带森林叶际的生物固氮量远超过根际土壤(Zhu et al, 2023)。从非豆科植物的叶片可分离到与根部相同的具有固氮功能的内生细菌, 如根瘤菌目、鞘脂单胞菌目等, 这类细菌能为宿主植物提供氮素营养(Abadi et al, 2021; Holland-Moritz et al, 2021)。然而, 豆科植物与非豆科植物内生细菌群落在结构与功能上差异的研究主要集中在根部, 对叶鲜有报道。

热带山地雨林是海南岛当前保存最完整、面积最大的热带森林, 具有面积广、物种多样性高、层次结构复杂等特点, 是我国热带地区具有国家和国际意义的生物多样性保护的典型性植被类型(方精云等, 2004; 许涵等, 2015)。在海南岛尖峰岭的热带山地雨林中, 豆科植物与非豆科植物对邻体植物的生物量、物种多样性、存活率等影响有明显差异(Xu et al, 2020); 豆科树种如软荚红豆(*Ormosia*

*semicastrata*)、木荚红豆(*O. xylocarpa*)、薄叶猴耳环(*Archidendron utile*)在个体大小、种群数量、固氮能力方面具有差异, 对邻体树木的生长表现出不同的效应(邓方立等, 2022)。本研究从海南尖峰岭热带山地雨林采集非豆科的优势植物樟科厚壳桂属(*Cryptocarya*), 以及豆科的红豆属(*Ormosia*)植物的叶片, 利用Illumina Miseq高通量测序平台检测两类植物叶内生细菌物种组成, 并用基于物种分类信息的FAPROTAX微生物地球化学循环代谢功能数据库解析细菌功能, 以回答如下问题: (1)尖峰岭热带山地雨林豆科和樟科叶内生细菌的多样性; (2)不同功能群的叶内生细菌在豆科和樟科植物上的差异; (3)叶性状对叶内生细菌群落构建的影响。通过比较豆科与樟科植物叶内生细菌群落功能差异及其构建驱动因子, 以期更深入地理解热带森林的植物适应性和生物多样性维持机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究地点概况

尖峰岭位于海南省西南部, 地处乐东县与东方市交界处(108°47′–109°02′ E, 18°38′–18°52′ N), 总面积约为640 ha, 森林覆盖率98%, 境内的热带雨林是我国现有面积较大、保存较完整的原始森林之一。本地区属热带岛屿季风气候, 干湿季分明, 日照充沛, 雨季主要集中在5–10月, 其余月份则为旱季, 从沿海至林区腹地的最高海拔(尖峰岭顶峰, 1,412.5 m)约15 km的水平距离内, 年平均降水量从1,300 mm增加至3,500 mm, 年平均气温24.5℃, 最冷月平均气温19.4℃, 最热月平均气温27.3℃(许涵等, 2015)。尖峰岭的植被随海拔由低到高, 依次为热带稀树草原、热带半落叶季雨林、热带常绿性季雨林、热带山地雨林、山顶苔藓矮林等5种植被类型。其中热带山地雨林集中在海拔700–1,300 m, 地形复杂, 物种组成丰富, 大多数种群的生态位宽度较小。土壤为砖黄壤-黄壤, 土壤各物理性质空间异质性明显(时雷雷等, 2012)。

### 1.2 样品采集

样品采集地点位于中国林业科学研究院尖峰岭森林生物多样性动态监测大样地内。大样地总面积为60 ha, 海拔为866–1,016 m, 共记录植物约为320种48.5万株, 植株密度达8,083株/ha。先将大样

地靠北边1,000 m × 300 m的区域划分为15个200 m × 100 m的网格, 从中随机挑取5个网格, 在网格近中部设1个40 m × 40 m的样方进行采样。据大样地历年每木调查数据, 在所选择样方中, 樟科植物以厚壳桂属中的厚壳桂(*Cryptocarya chinensis*)与硬壳桂(*C. chingii*)为主, 豆科植物以红豆属中的长脐红豆(*O. balansae*)与软荚红豆为主。采集厚壳桂与软荚红豆各4株, 硬壳桂与长脐红豆各采集3株。在每个样方中找到目标树种, 用加长高枝剪从树冠上剪取3个枝条, 摘取成熟、健康的叶片分别装于3个塑料封口袋中, 并及时转运至实验室–20℃保存, 供后续DNA提取。

### 1.3 16S rRNA基因测序及细菌鉴定

从每袋叶中取出48片, 在酒精灯前用打孔器(直径3 mm)在每张叶片上避开叶脉打1个孔, 取出所有的小圆叶片后, 均匀分成3份放入2 mL圆底离心管, 在此过程中所用到的工具使用前均需灭菌。为了将附在叶片表面的灰尘、附生微生物去除, 先向离心管内加入400 μL ddH<sub>2</sub>O : Tween 20 (1 : 1,000), 混匀后置于200 r/min振荡器中摇晃15 min, 使用移液枪将溶液吸净; 再加400 μL 75%乙醇浸泡并摇晃5 min, 将溶液吸净后再加800 μL无菌水洗涤5次, 每次置于涡旋振荡器上震荡30 s, 并使用移液枪将溶液吸净。后续参考(黄彩薇等, 2017)的方法提取叶片总DNA (包含植物和微生物)。

将每株树提取到的9份DNA混合为1个样品, 委托上海生工生物工程有限公司在Illumina Miseq测序平台下使用引物341F (5′-CCTACGGGNGGCWGCAG-3′)和引物805R (5′-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3′)对叶内生细菌16S rRNA基因的V3–V4区进行测序(Sinclair et al, 2015)。首先将得到的原始序列去除引物接头, 使用PEAR将成对reads拼接成1条序列, 然后根据barcode序列和引物序列分割出各样本数据, 并校正序列方向。使用PRINSEQ对各样本序列进行剪切过滤得到优化reads序列。所有样本去冗余序列合并后去除没有重复的单序列, 按照97%相似性对非重复序列进行可操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)聚类, 在聚类过程中去除嵌合体, 得到OTU代表序列后, 生成OTU多度表格。最后使用Ribosomal Database Project (RDP)数据库比对OTU代表序列,



得到每个OTU对应的物种分类信息, 分别在各个分类水平: 域、门、纲、目、科、属上统计各样本叶内生细菌组成。将有明确分类信息的OTUs置于FAPROTAX微生物代谢功能群数据库中检索, 以划分代谢功能群(Louca et al, 2016)。

#### 1.4 植物叶性状测量

从采集的14株植物里挑选出每植株成熟、健康、完整的叶片共48片, 将叶片分成3等份后分别测定6个叶形态结构性状指标: (1)叶面积(leaf area, LA): 将新鲜叶擦净平展后利用叶面积仪(LI-COR3000C Area Meter, LI-COR, USA)进行测量; (2)鲜重(fresh weight, FW): 洗净擦干后的叶用电子天平称其鲜重; (3)干重(dry weight, DW): 将称好鲜重的叶装入信封并做好标记后在65℃环境下烘72 h, 待样品恒重后称量干重, 以便后续使用计算其他指标包括: (4)比叶面积(specific leaf area, SLA)、(5)叶干物质含量(leaf dry matter content, LDMC)、(6)叶含水量(leaf water content, LWC)。叶化学计量性状指标分别使用以下方法进行测定: 采用凯氏定氮蒸馏测定叶全氮(leaf nitrogen content, LNC); 钼锑抗比色法测定叶全磷(leaf phosphorus content, LPC); 火焰光度法测定叶全钾(leaf potassium content, LKC); 测定叶全钙(leaf calcium content, LCaC)含量时先用硝酸-高氯酸对样品进行消煮, 然后采用原子吸收仪测定其含量(鲍士旦, 2000; 鲁如坤, 2000)。

#### 1.5 数据分析

构建细菌-植物矩阵, 计算叶内生细菌群落物种和细菌功能群在不同植物上的丰富度及相对多度, 进一步采用主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)以及相似性分析(analysis of similarities, ANOSIM)检验樟科与豆科植物叶内生细菌群落物种组成是否有差异。用Kruskal-Wallis检验叶内生细菌代谢功能群在宿主植物间是否有显著差异。将细菌-植物矩阵的数据经Hellinger转换后, 进一步用非度量多维尺度(non-metric multidimensional scaling, NMDS)结合环境向量拟合分析(environmental vector fitting, Envfit)探究宿主植物性状对叶内生细菌群落结构及细菌代谢功能群的影响。所有数据分析在R 4.1.2中进行, 使用的软件包有vegan (v2.6.2)、ggplot2 (v3.3.6)、microeco (v0.15.0)。

## 2 结果

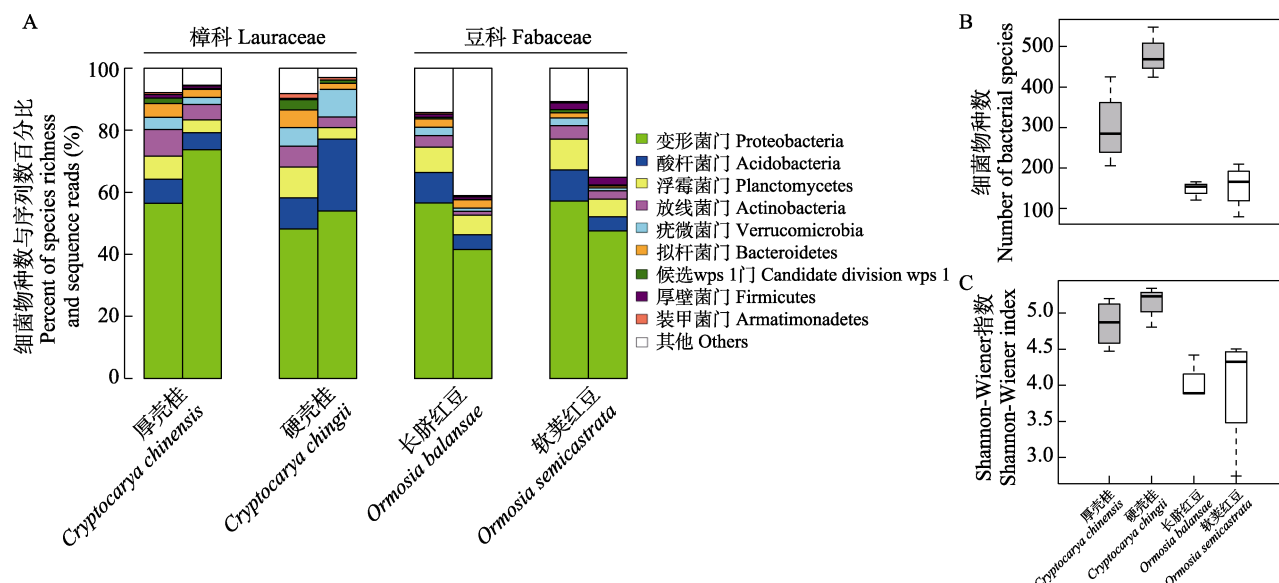
### 2.1 豆科与樟科植物叶内生细菌多样性

从海南尖峰岭热带山地雨林大样地的樟科与豆科共14株植物的叶组织检测到758,918条序列, 每植株的reads数介于34,293–88,140之间, 豆科植物平均reads数为 $49,782 \pm 5,146$ , 樟科植物为 $58,634 \pm 6,912$ (附录1)。物种累积曲线表明, 在该测序深度下, 豆科与樟科植物增加OTUs数的趋势随着reads数的增加而逐渐平缓(附录2)。按最低reads值(34,293)将每植株reads数稀释后, 每植物的OTUs数介于202–630, 在相同测序深度下, 樟科植物的OTUs数要高于豆科植物(附录3)。经16S数据库比对后有20,953条序列被鉴定为细菌序列, 被划分为1,123个OTUs, 涉及21门36纲51目92科160属。reads数超过1%的细菌类群为变形菌门(57.17%), 共包含600个OTUs, 其在厚壳桂、硬壳桂、长脐红豆和软荚红豆中的reads数分别达73.45%、53.77%、40.49%和47.87%; 其次为酸杆菌门(15.12%), 共包含72个OTUs, 其在厚壳桂、硬壳桂、长脐红豆和软荚红豆中分别达5.37%、23.12%、4.61%和4.60%。疣微菌门(5.85%)、放线菌门(3.24%)和拟杆菌门(2.12%)在樟科植物所占的比列高于豆科植物, 而浮霉菌门(4.62%)呈现的规律与之相反, 即在豆科植物所占比例较高。此外, 绿弯菌门序列数在长脐红豆植物占比最高为3.92%, 在其余植物占比则较低(0.08%–0.33%); 厚壁菌门序列数在软荚红豆中所占的比例较高(2.28%), 而在非豆科植物中所占比例较低(0.06%–0.72%)(图1A)。樟科植物的叶内生细菌物种数(206–548种)与Shannon-Wiener多样性指数(4.40–5.27)均高于豆科植物(80–210种, 2.82–4.49)(图1B, C)。

基于Bray-Curtis距离的PCoA研究结果发现, 豆科植物与樟科植物明显形成独自的聚类, PcoA 1和PcoA 2分别解释了叶内生细菌群落总变异的26.5%和18.5%。通过ANOSIM检验, 结果表明豆科与樟科植物叶内生细菌群落的物种组成存在显著差异( $R = 0.5792$ ,  $P = 0.004$ )(图2)。

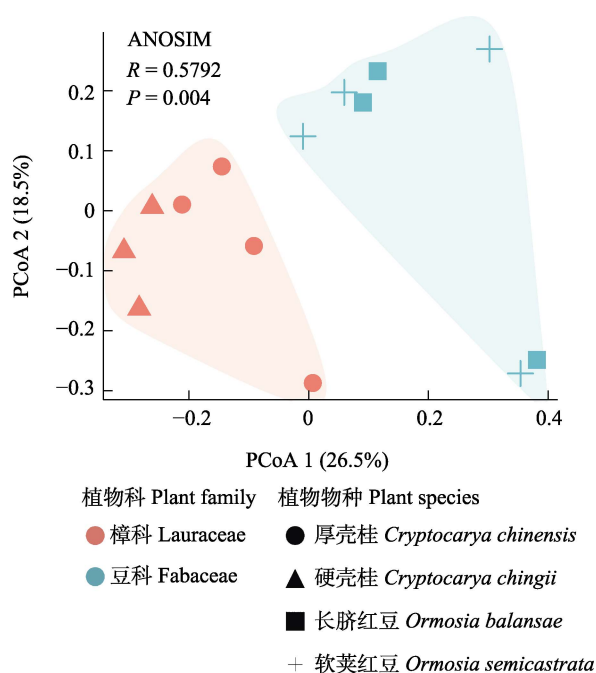
### 2.2 豆科与樟科植物叶内生细菌功能群落多样性

将叶内生细菌物种分类信息与FAPROTAX数据库进行比对, 成功将占总reads数54.63%的489个OTUs进行功能注释, 共涉及6类元素循环(主要为



**图1** 4种豆科与樟科植物叶内生细菌多样性比较。**A**: 各门内生细菌物种数(左柱)与序列数百分比(右柱); **B**: 叶内生细菌物种数; **C**: Shannon-Wiener指数)。

Fig. 1 A comparison of foliar endophytic bacteria diversity among the 4 species of Fabaceae and Lauraceae. A, Percent species richness (left column) and sequence reads (right column) at phylum level; B, Species richness; C, Shannon-Wiener's index.



**图2** 4种豆科与樟科植物叶内生细菌群落物种组成的PCoA分析及ANOSIM检验

Fig. 2 Principal coordinate analysis (PCoA) and analysis of similarity (ANOSIM) of foliar endophytic bacterial community of four Fabaceae and Lauraceae plants

碳元素与氮元素循环)以及2类细菌特征(寄生菌和病原菌), 具体包含28种功能。其中共有388个OTUs

仅有1种功能, 36个OTUs具有2种功能, 65个OTUs具两种以上功能。278个OTUs具有好氧化能异养(aerobic chemoheterotrophy)功能, 其序列占比总有效序列的23.79%; 76个OTUs (23.30%)具有固氮(nitrogen fixation)功能; 以噬纤维菌目为主的50个OTUs具有纤维素分解功能(cellulolysis), 占总有效序列1.12%; 39个OTUs共占有有效序列4.85%可以分解尿素(ureolysis); 33个OTUs (4.68%)具甲醇氧化(methanol oxidation)功能以及32个OTUs (4.62%)具甲烷氧化(methanotrophy)功能。通过检验结果表明以上6类功能的叶内生细菌群落在豆科与樟科间有显著差异。其中具有甲烷氧化功能的细菌群落在两个宿主植物科间差异最大( $\chi^2 = 7.5$ ,  $P = 0.006$ ), 在樟科植物中相对多度为5.2%, 在豆科植物中相对多度为2.2%; 其次为具尿素分解功能的细菌群( $\chi^2 = 7.5$ ,  $P = 0.006$ ); 具固氮功能的细菌群落(Kruskal-Wallis:  $\chi^2 = 4.4$ ,  $P = 0.035$ ), 在樟科和豆科植物所占比例分别为26%、15.44%。具有好氧化能异养功能的细菌群落在樟科和豆科之间具有显著差异( $\chi^2 = 3.9$ ,  $P = 0.047$ ), 且均为樟科与豆科植物主要的叶内生细菌功能群(图3, 附录4)。樟科植物与豆科植物各具25种和26种细菌功能群, 其中锰氧化(manganese oxidation)功能的细菌仅在樟科植物出现, 好氧氨氧

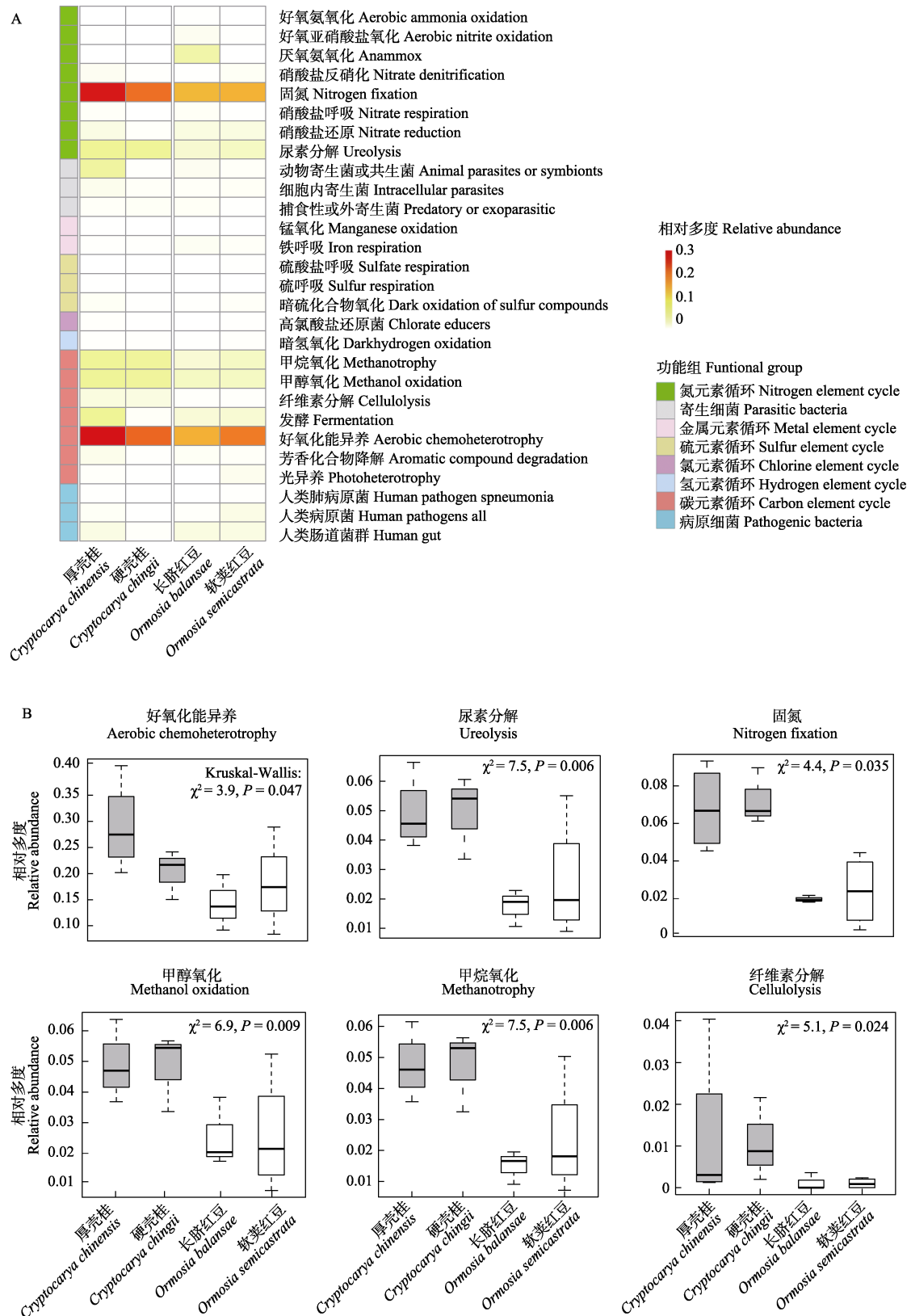


图3 樟科与豆科植物叶内生细菌功能群组成的热图(A)及主要功能的相对多度(B)  
Fig. 3 Heatmap of functional group profiles (A) and key functional groups (B) of foliar endophytic bacteria in the Lauraceae and Fabaceae plant species

化(aerobic ammonia oxidation)和厌氧氨氧化(anammox)细菌功能群仅在豆科植物中检测到。

### 2.3 豆科与樟科植物叶内生细菌群落物种组成及细菌功能群的影响因子

基于Bray-Curtis距离对樟科和豆科植物叶内生细菌群落进行NMDS分析,结果表明NMDS能够较好地展示叶内生细菌群落的差异性(stress = 0.079)。通过Envfit将宿主植物叶性状拟合到NMDS分析中,发现在10个宿主植物叶性状中只有叶全钾含量(LKC)和比叶面积(SLA)对叶内生细菌群落物种组成有影响,其与细菌群落物种组成的相关系数分别为0.4135 ( $P = 0.047$ )、0.5272 ( $P = 0.023$ ) (图4A, 附录4)。在植物与细菌功能群分析结果中比叶面积和叶全磷含量(LPC)均是影响樟科与豆科功能细菌群落的重要因子,其相关系数分别为0.5998 ( $P = 0.007$ )、0.4168 ( $P = 0.047$ ) (图4B, 附录4)。

## 3 讨论

### 3.1 热带山地雨林豆科与樟科植物叶内生细菌群落多样性与影响因子

从尖峰岭热带山地雨林的豆科与樟科共4种植物检测到叶内生细菌OTUs达1,123个,涉及21门36纲51目92科160属,主要包括变形菌门、酸杆菌门、疣微菌门、浮霉菌门、放线菌门、厚壁菌门和拟杆菌门,均为广泛分布的热带地区植物内生细菌(Barman & Dkhar, 2019)。其中酸杆菌门、疣微菌门

与浮霉菌门也是尖峰岭热带山地雨林土壤细菌群落中的优势类群(唐欣等, 2019), 此类细菌在其他地区的植物叶内生细菌群落中虽有报道但多度极低(Trivedi et al, 2020); 马来西亚热带雨林叶际与土壤的细菌群落也表现出相同的规律(Kim et al, 2012)。土壤细菌可能会通过植物根系进入到植物体内, 在植物蒸腾的拉力驱动下, 定居到植物各组织内部(Xu et al, 2022)。尖峰岭热带山地雨林中的豆科植物与樟科植物的叶内生细菌群落物种组成有显著差异, 说明宿主植物的身份是叶内生细菌群落构建的驱动因子之一, 类似效应在其他研究中已有报道, 如在圭亚那热带低地雨林的叶内生细菌群落物种组成10%的变异量能被宿主身份解释(Donald et al, 2020), 美国俄克拉荷马州北部的高草原保护区的不同植物种的优势叶内生细菌群具有宿主植物特异性(Ding et al, 2016)。叶内生细菌群落的构建还会受叶性状(如叶总氮、水分、干物质含量等)影响(Kembel et al, 2014; Wei et al, 2022)。而影响尖峰岭热带山地雨林叶内生细菌群落构建的叶性状为叶全钾含量与比叶面积, 二者与植物的光合速率密切相关(Cornelissen et al, 2003)。

### 3.2 豆科与樟科植物叶内生细菌功能群落多样性差异及影响因子

FAPROTAX微生物代谢功能数据库基于已发表验证的可培养细菌文献进行构建, 目前主要对环境样本微生物的生物地球化学循环过程进行代谢

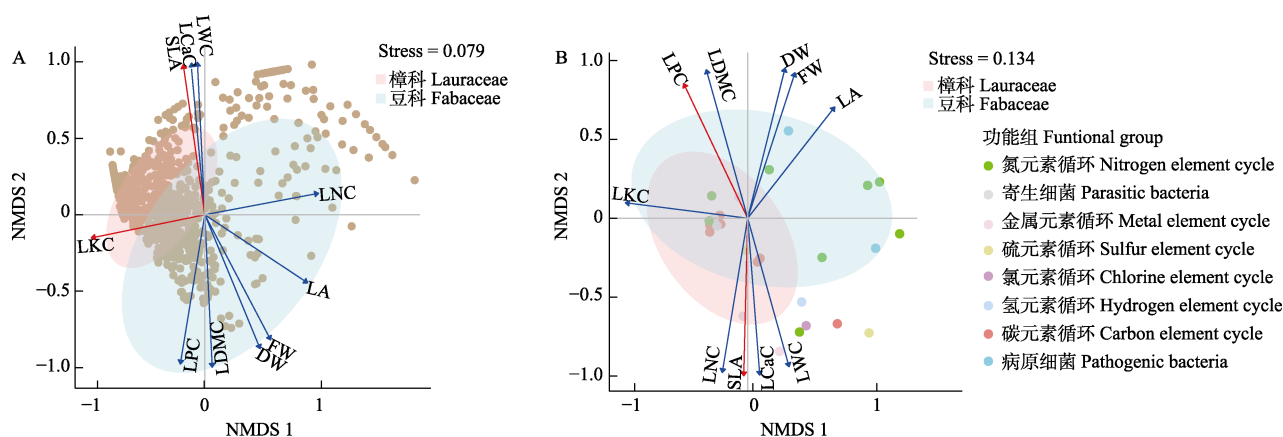


图4 宿主植物叶性状与叶内生细菌群落物种(A)及功能群(B)组成的相关性。SLA: 比叶面积; FW: 鲜重; DW: 干重; LDMC: 叶干物质含量; LWC: 叶含水量; LA: 叶面积; LKC: 叶全钾含量; LNC: 叶全氮含量; LPC: 叶全磷含量; LCaC: 叶全钙含量。  
Fig. 4 Correlation between host plant leaf traits and foliar endophytic bacterial community species (A) and functional group (B) compositions. SLA, Specific leaf area; FW, Fresh weight; DW, Dry weight; LDMC, Leaf dry matter content; LWC, Leaf water content; LA, Leaf area; LKC, Leaf potassium content; LNC, Leaf nitrogen content; LPC, Leaf phosphorus content; LCaC, Leaf calcium content.



功能注释预测(Louca et al, 2016)。在樟科与豆科植物叶内生细菌中共有489个OTUs细菌可分配到至少一个代谢功能组, 共涉及28类的功能, 6类代谢功能群在豆科叶内生细菌群落中的相对多度显著高于非豆科宿主植物, 如固氮功能群的细菌在樟科的占比显著高于豆科植物。尖峰岭热带山地雨林中的固氮菌由根瘤菌目、伯克霍尔德氏菌目和红环菌目构成, 其中根瘤菌目和伯克霍尔德氏菌目这两类细菌是叶际内生微生物组中报道较多的固氮菌(Zhu et al, 2023)。固氮细菌在叶际微生物组中较普遍, 其产生的生物固氮是陆地生态系统的主要氮输入之一(Zhu et al, 2023), 如亚马逊热带雨林和哥斯达黎加热带低地雨林叶际平均每年的生物固氮能力超过300 g/ha (Fürrkranz et al, 2008; Moreira et al, 2021)。叶际固氮菌群落和固氮活动同样受生物因素如宿主植物身份和非生物因素如气候、土壤养分等影响(Zhu et al, 2023)。豆科植物的叶氮含量普遍高于非豆科植物(Nurbolat et al, 2022), 而氮含量高可能会抑制固氮菌的定殖(Li et al, 2023)。因此我们推测在尖峰岭热带山地雨林中豆科植物通过根瘤菌固氮来满足氮素需求, 而缺少根瘤共生体的樟科植物通过有固氮功能的叶内细菌来适应热带山地雨林的低氮土壤环境。

类似的, 甲烷氧化细菌在樟科与豆科植物中的分布也有较大差异。甲烷营养型细菌将甲烷和氧化物质结合起来, 在细胞内进行催化反应, 最终实现将甲烷氧化成更易溶解和稳定的化合物如氮化物或硫酸盐供植物或其他微生物进行生长代谢, 并释放出能量供自身使用(Yoneyama et al, 2019)。该功能的细菌在许多非豆科植物如水稻、甘蔗等植物组织中有分布, 甚至有些物种如甲基弯菌(*Methylosinus* sp.)同时具有固氮作用(Bao et al, 2014), 且其分布也会受氮含量的影响(Ikeda et al, 2014)。

此外, 好氧化能异养型的细菌较为常见, 以有机物质作为碳源和能源, 通过有氧呼吸获得能量(Rivett & Bell, 2018)。这类细菌在本研究达278个OTUs, 为樟科和豆科植物叶内生细菌群落的主要功能群。在水生藻类生长周期内该功能也占主要地位(Jung et al, 2021)。除此之外, 厚壳桂属和红豆属植物都定居着具纤维素分解功能的细菌, 主要为噬纤维菌目的细菌, 该类细菌利用纤维素中的葡萄

糖分子作为碳源和能源, 通过分泌纤维素酶来降解纤维素。这种功能在许多生态系统中非常重要, 因为它可以将植物中的碳转化为可供其他生物利用的形式。

非参数检验中的环境因子拟合结果表明, 植物的比叶面积与叶全磷含量能影响叶内生细菌功能群的组成。碳与氮元素循环是本研究细菌代谢功能群中主要涉及的两大元素循环。碳元素循环主要与叶全钾含量和比叶面积相关, 而氮元素循环主要与叶面积相关。通常, 比叶面积大的叶倾向于更大的光合速率, 而较低的比叶面积值意味着资源优先投入叶抵御外界压力和增加叶的寿命(Cornelissen et al, 2003)。因此在比叶面积不同的植物叶累积的有机质含量不同, 会限制内生细菌可利用资源从而影响定殖。此外, 细菌功能群在豆科与樟科植物的差异可能与细菌可利用资源的差异有关, 如叶中碳水化合物可利用性, 挥发性有机化合物(如甲醇)的产生速度以及抗菌化合物的数量等(Westoby et al, 2002)。涉及碳、氮代谢的6类代谢功能群的叶内生细菌在樟科植物中的相对多度普遍高于豆科植物, 可能是尖峰岭热带山地雨林非豆科植物对低有效养分的土壤环境的适应性机制之一。

## 参考文献

- Abadi VAJM, Sepehri M, Rahmani HA, Dolatabad HK, Shamshiripour M, Khatabi B (2021) Diversity and abundance of culturable nitrogen-fixing bacteria in the phyllosphere of maize. *Journal of Applied Microbiology*, 131, 898–912.
- Bao SD (2000) *Soil and Agricultural Chemistry Analysis*, 3rd edn. China Agricultural Press, Beijing. (in Chinese) [鲍士旦 (2000) 土壤农化分析(第三版). 中国农业出版社, 北京.]
- Bao ZH, Okubo T, Kubota K, Kasahara Y, Tsurumaru H, Anda M, Ikeda S, Minamisawa K (2014) Metaproteomic identification of diazotrophic methanotrophs and their localization in root tissues of field-grown rice plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 5043–5052.
- Barman D, Dkhar MS (2019) Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Costus speciosus* in tropical deciduous forest of eastern Himalaya. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89, 841–852.
- Batterman SA, Hedin LO, van Breugel M, Ransijn J, Craven DJ, Hall JS (2013) Key role of symbiotic dinitrogen fixation in tropical forest secondary succession. *Nature*, 502, 224–227.
- Bērtiņš M, Klūga A, Dubova L, Petrēvics P, Alsina I, Vīksna A (2021) Study of rhizobia impact on nutritional element concentration in legumes. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences Section B Natural, Exact, and Applied*



- Sciences, 75, 457–462.
- Cornelissen J, Lavorel S, Garnier E, Díaz S, Buchmann N, Gurvich DE, Reich PB, Steege HT, Morgan HD, Heijden M (2003) A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 51, 335–380.
- Cunha HFV, Andersen KM, Lugli LF, Santana FD, Aleixo IF, Moraes AM, Garcia S, Di Ponzio R, Mendoza EO, Brum B, Rosa JS, Cordeiro AL, Portela BTT, Ribeiro G, Coelho SD, de Souza ST, Silva LS, Antonieto F, Pires M, Salomão AC, Miron AC, de Assis RL, Domingues TF, Aragão LEOC, Meir P, Camargo JL, Manzi AO, Nagy L, Mercado LM, Hartley IP, Quesada CA (2022) Direct evidence for phosphorus limitation on Amazon forest productivity. *Nature*, 608, 558–562.
- Deng FL, Xu H, Chen J, Lin MX, Li YD (2022) Effects of leguminous trees on neighboring tree species in the tropical mountainous rainforest of Jianfengling. *Forest Research*, 35(3), 1–8. (in Chinese with English abstract) [邓方立, 许涵, 陈洁, 林明献, 李意德 (2022) 尖峰岭热带山地雨林豆科树木对邻体树种的影响. *林业科学研究*, 35(3), 1–8.]
- Ding T, Ulrich M, Lorenzo B (2016) Influences of plant species, season and location on leaf endophytic bacterial communities of non-cultivated plants. *PLoS ONE*, 11, e0150895.
- Donald J, Roy M, Suescun U, Iribar A, Manzi S, Péllissier L, Gaucher P, Chave J, Singh B (2020) A test of community assembly rules using foliar endophytes from a tropical forest canopy. *Journal of Ecology*, 108, 1605–1616.
- Dudeja SS, Giri R, Saini R, Suneja-Madan P, Kothe E (2012) Interaction of endophytic microbes with legumes. *Journal of Basic Microbiology*, 52, 248–260.
- Epihov DZ, Saltonstall K, Batterman SA, Hedin LO, Hall JS, van Breugel M, Leake JR, Beerling DJ (2021) Legume-microbiome interactions unlock mineral nutrients in regrowing tropical forests. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 118, e2022241118.
- Fang JY, Li YD, Zhu B, Liu GH, Zhou GY (2004) Community structure, species diversity, and position in the global rainforest of Jianfengling mountainous rainforest on Hainan Island in China. *Biodiversity Science*, 12, 29–43. (in Chinese with English abstract) [方精云, 李意德, 朱彪, 刘国华, 周光益 (2004) 海南岛尖峰岭山地雨林的群落结构、物种多样性以及在世界雨林中的地位. *生物多样性*, 12, 29–43.]
- Fürnkranz M, Wanek W, Richter A, Abell G, Rasche F, Sessitsch A (2008) Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. *The ISME Journal*, 2, 561–570.
- Holland-Moritz H, Stuart JEM, Lewis LR, Miller SN, Mack MC, Ponciano JM, McDaniel SF, Fierer N (2021) The bacterial communities of Alaskan mosses and their contributions to N-fixation. *Microbiome*, 9, 53.
- Hong CE, Jo SH, Moon JY, Lee JS, Kwon SY, Park JM (2015) Isolation of novel leaf-inhabiting endophytic bacteria in *Arabidopsis thaliana* and their antagonistic effects on phytopathogens. *Plant Biotechnology Reports*, 9, 451–458.
- Houlton BZ, Wang YP, Vitousek PM, Field CB (2008) A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature*, 454, 327–330.
- Huang CW, Liao YH, Ding Q (2017) Two sample pooling strategies revealed different root-associated fungal diversity of *Rhododendron* species. *Acta Microbiologica Sinica*, 57, 571–518. (in Chinese with English abstract) [黄彩微, 廖映辉, 丁琼 (2017) 两种混合样品策略对揭示杜鹃花根部真菌多样性的影响. *微生物学报*, 57, 571–581.]
- Ikeda S, Sasaki K, Okubo T, Yamashita A, Terasawa K, Bao ZH, Liu DY, Watanabe T, Murase J, Asakawa S, Eda SM, Mitsui H, Sato T, Minamisawa K (2014) Low nitrogen fertilization adapts rice root microbiome to low nutrient environment by changing biogeochemical functions. *Microbes and Environments*, 29, 50–59.
- Jung SW, Kang JS, Park JS, Joo HM, Suh SS, Kang D, Lee TK, Kim HJ (2021) Dynamic bacterial community response to *Akashiwo sanguinea* (Dinophyceae) bloom in indoor marine microcosms. *Scientific Reports*, 11, 6983.
- Kandasamy GD, Kathirvel P (2023) Insights into bacterial endophytic diversity and isolation with a focus on their potential applications—A review. *Microbiological Research*, 266, 127256.
- Kembel SW, O'Connor TK, Arnold HK, Hubbell SP, Wright SJ, Green JL (2014) Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 111, 13715–13720.
- Kim M, Singh D, Lai-Hoe A, Go R, Rahim RA, Ainuddin AN, Chun J, Adams JM (2012) Distinctive phyllosphere bacterial communities in tropical trees. *Microbial Ecology*, 63, 674–681.
- Li S, Wu CB, Liu H, Lyu XC, Xiao FS, Zhao SH, Ma CM, Yan C, Liu ZL, Li HY, Wang XL, Gong ZP (2023) Systemic regulation of nodule structure and assimilated carbon distribution by nitrate in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1101074.
- Louca S, Parfrey LW, Doebeli M (2016) Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science*, 353, 1272–1277.
- Lu RK (2000) *Methods of Soil Agricultural Chemical Analysis*. China Agricultural Science and Technology Press, Beijing. (in Chinese) [鲁如坤 (2000) 土壤农业化学分析方法. 中国农业科技出版社, 北京.]
- Luo D, Cheng RM, Shi ZM, Wang WX, Xu GX, Liu SR (2016) Impacts of nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing tree species on soil respiration and microbial community composition during forest management in subtropical China. *Ecological Research*, 31, 683–693.
- Moreira JCF, Brum M, de Almeida LC, Barrera-Berdugo S, de Souza AA, de Camargo PB, Oliveira RS, Alves LF, Rosado BHP, Lambais MR (2021) Asymbiotic nitrogen fixation in the phyllosphere of the Amazon forest: Changing nitrogen cycle paradigms. *Science of the Total Environment*, 773, 145066.
- Nurbolat S, Lv GH, Jiang LM, Zhang L (2022) Convergent variation in the leaf traits of desert plants in the Ebinur Lake basin. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 927572.
- Rivett DW, Bell T (2018) Abundance determines the functional role of bacterial phylotypes in complex communities. *Nature Microbiology*, 3, 767–772.

- Shi LL, Luo TS, Xu H, Lin MX, Yang H, Chen DX, Li YD (2012) The fine scale spatial heterogeneity of soil physical properties in a primary tropical montane rainforest of Jianfengling, Hainan Island, China. *Forest Research*, 25, 285–293. (in Chinese with English abstract) [时雷雷, 骆士寿, 许涵, 林明献, 杨怀, 陈德祥, 李意德 (2012) 尖峰岭热带山地雨林土壤物理性质小尺度空间异质性研究. *林业科学研究*, 25, 285–293.]
- Sinclair L, Osman OA, Bertilsson S, Eiler A (2015) Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: Evaluating the Illumina platform. *PLoS ONE*, 10, e0116955.
- Sprent JI, Ardley J, James EK (2017) Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*, 215, 40–56.
- Sun F, Song CJ, Wang M, Lai DYF, Tariq A, Zeng FJ, Zhong QP, Wang FM, Li ZA, Peng CL (2020) Long-term increase in rainfall decreases soil organic phosphorus decomposition in tropical forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 151, 108056.
- Tang X, Liu SR, Xu H, Zhang YG (2019) Estimation of soil microbial species in the 60-hm<sup>2</sup> dynamic monitoring plot of tropical mountain rainforest in Jianfengling, Hainan Island. *Scientia Silvae Sinicae*, 55(12), 84–92. (in Chinese with English abstract) [唐欣, 刘世荣, 许涵, 张于光 (2019) 海南尖峰岭热带山地雨林60 hm<sup>2</sup>动态监测样地土壤微生物物种估算. *林业科学*, 55(12), 84–92.]
- Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, Sa TM, Singh BK (2020) Plant-microbiome interactions: From community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 607–621.
- Wei YQ, Lan GY, Wu ZX, Chen BQ, Quan F, Li MM, Sun SQ, Du HN (2022) Phyllosphere fungal communities of rubber trees exhibited biogeographical patterns, but not bacteria. *Environmental Microbiology*, 24, 3777–3790.
- Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA, Wright IJ (2002) Plant ecological strategies: Some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 125–159.
- Xu H, Detto M, Fang S, Chazdon RL, Li Y, Hau BCH, Fischer GA, Weiblen GD, Hogan JA, Zimmerman JK, Uriarte M, Thompson J, Lian J, Cao K, Kenfack D, Alonso A, Bissengou P, Memiaghe HR, Valencia R, Yap SL, Davies SJ, Mi X, Yao TL (2020) Soil nitrogen concentration mediates the relationship between leguminous trees and neighbor diversity in tropical forests. *Communications Biology*, 3, 317.
- Xu H, Li YD, Lin MX, Wu JH, Luo TS, Zhou Z, Chen DX, Yang H, Li GJ, Liu SR (2015) Community structure and characteristics of the 60 ha dynamic monitoring plot of tropical mountain rainforest in Jianfengling, Hainan Island. *Biodiversity Science*, 23, 192–201. (in Chinese with English abstract) [许涵, 李意德, 林明献, 吴建辉, 骆士寿, 周璋, 陈德祥, 杨怀, 李广建, 刘世荣 (2015) 海南尖峰岭热带山地雨林60 ha动态监测样地群落结构特征. *生物多样性*, 23, 192–201.]
- Xu NH, Zhao QQ, Zhang ZY, Zhang Q, Wang Y, Qin GY, Ke MJ, Qiu DY, Peijnenburg WJGM, Lu T, Qian HF (2022) Phyllosphere microorganisms: Sources, drivers, and their interactions with plant hosts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70, 4860–4870.
- Yoneyama T, Terakado-Tonooka J, Bao Z, Minamisawa K (2019) Molecular analyses of the distribution and function of diazotrophic rhizobia and methanotrophs in the tissues and rhizosphere of non-leguminous plants. *Plants*, 8, 408.
- Zhu YG, Peng JJ, Chen C, Xiong C, Li SL, Ge AH, Wang ET, Liesack W (2023) Harnessing biological nitrogen fixation in plant leaves. *Trends in Plant Science*, doi: 10.1016/j.tplants.2023.05.009.

(责任编辑: 东秀珠 责任编辑: 李会丽)

## 附录 Supplementary Material

### 附录1 豆科植物与樟科植物采样情况与叶内生细菌多样性指数

Appendix 1 Sampling of Fabaceae and Lauraceae and diversity index of endophytic bacteria in leaves  
<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2023146-1.pdf>

### 附录2 豆科(A)与樟科(B)基于采样植株数的叶内生细菌的物种累积曲线

Appendix 2 Species accumulation curves of foliar endophytic bacteria in Fabaceae (A) and Lauraceae (B) based on the number of sampled tree individuals  
<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2023146-2.pdf>

### 附录3 基于标准化reads数的单株(A)和单种(B)植物的叶内生细菌OTUs稀释曲线

Appendix 3 Rarefaction curves of bacterial OTUs based on normalized number of sequence reads by tree individuals (A) and by tree species (B)  
<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2023146-3.pdf>

### 附录4 宿主植物叶性状与叶内生细菌群落物种组成及细菌功能群的相关性

Appendix 4 Correlation of host plant leaf traits on foliar endophytic bacterial species and functional group compositions  
<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2023146-4.pdf>

附录 1 豆科植物与樟科植物采样情况与叶内生细菌多样性指数

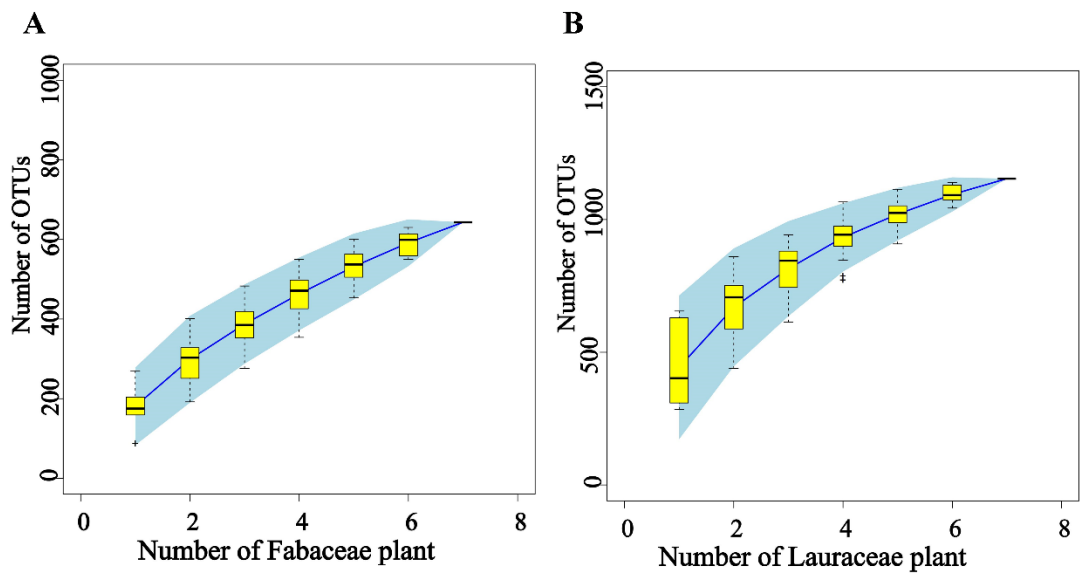
Appendix 1 Sampling of Fabaceae and Lauraceae and diversity index of endophytic bacteria in leaves

	植株数	总 reads 数	总 OTUs 数	reads 数/株	有效 reads 数/株	有效 OTUs 数/株	Rarefied OTUs 数/株	总有效 reads 数	总有效 OTUs 数	香农-威纳指数	测序覆盖度
豆科	7	348,477	885	49,782±5,146	901±141	181±21	152±16	6,307	643	4.01±0.23	0.961±0.014
樟科	7	410,441	1428	58,634±6,912	3,930±995	457±56	377±46	27,511	1154	5.00±0.12	0.935±0.017

有效 reads 为去除植物序列的 reads。

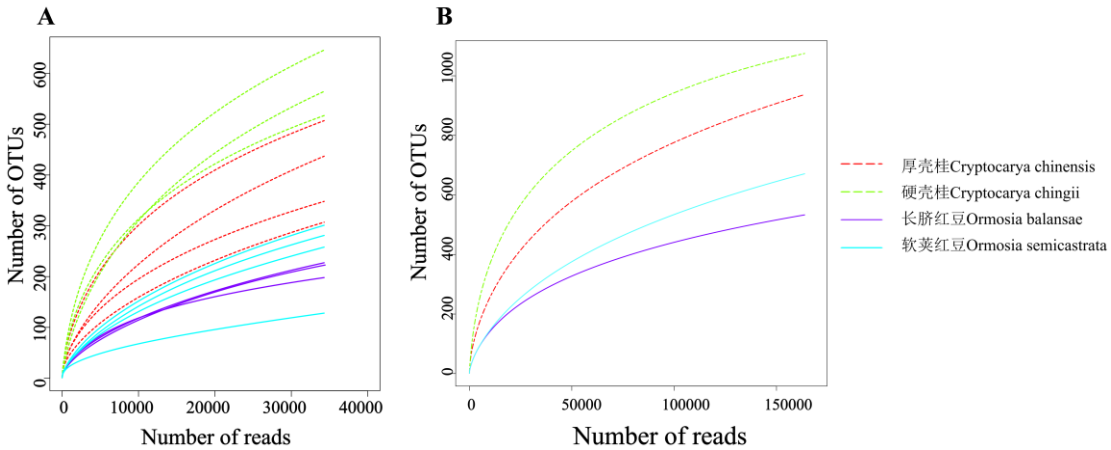
Valid reads are those with plant sequences removed.





附录 2 豆科(A)与樟科(B)基于采样植株数的叶内生细菌的物种累积曲线

Appendix 2 Species accumulation curves of foliar endophytic bacteria in Fabaceae (A) and Lauraceae (B) based on the number of sampled tree individuals



附录 3 基于标准化 reads 数的单株(A)和单种(B)植物的叶内生细菌 OTUs 稀释曲线  
Appendix 3 Rarefaction curves of bacterial OTUs based on normalized number of sequence reads  
by tree individuals (A) and by tree species (B)

附录 4 宿主植物叶性状对叶内生细菌群落物种组成及细菌功能群的及细菌功能群的相关性

Appendix 4 Impact of host plant leaf traits on foliar endophytic bacterial species and functional group compositions

宿主植物叶性状		叶内生细菌物种组成		叶内生细菌功能群组成	
Host plant leaf traits		Foliar endophytic bacterial species composition		Foliar endophytic bacterial functional group composition	
		$R^2$	$P$ value	$R^2$	$P$ value
叶计量化学性状 Leaf stoichiometric traits	叶全钾含量 LKC	<b>0.4135</b>	<b>0.047</b>	0.3517	0.087
	叶全氮含量 LNC	0.0313	0.848	0.0146	0.929
	叶全磷含量 LPC	0.3245	0.116	<b>0.4168</b>	<b>0.047</b>
叶形态性状 Leaf morphological traits	叶全钙含量 LCaC	0.1204	0.509	0.0576	0.736
	比叶面积 SLA	<b>0.5272</b>	<b>0.023</b>	<b>0.5998</b>	<b>0.007</b>
	叶鲜重 FW	0.1359	0.461	0.2444	0.221
	叶干重 DW	0.1511	0.423	0.2515	0.211
	叶干物质含量 LDMC	0.0868	0.596	0.007	0.962
	叶含水量 LWC	0.0868	0.596	0.007	0.962
	叶面积 LA	0.0835	0.656	0.1623	0.397