

周靖钰, 黄国伟, 张亚东, 等. 江汉平原黑杨湿心材细菌微生物群落结构解析[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(4): 221-229.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.04.024

江汉平原黑杨湿心材细菌微生物群落结构解析

周靖钰¹, 黄国伟², 张亚东², 祁高富¹, 张新叶²

1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 湖北省林业科学研究院, 武汉 430079

摘要 为探究细菌微生物群落在杨树湿心材发病过程中的作用, 以江汉平原6年生华石2号黑杨湿心材和正常材为研究对象, 采用高通量测序对16S rRNA基因V5—V7区进行测序, 对测序列结果进行信息学分析, 利用主成分分析、 α 多样性指数分析和微生物网络分析技术等方法, 探究6年生黑杨湿心材和正常材细菌微生物群落结构和组成差异。结果表明: 6年生华石2号黑杨湿心材和正常材细菌微生物群落属水平上, 劳尔氏菌属和拟杆菌属的细菌丰度最高, 拟杆菌属、多形单胞菌属和氢孢菌属在湿心材中占比显著高于正常材($P < 0.05$)。微生物群落功能分析显示, 劳尔氏菌属多为植物病原菌, 在湿心材中广泛存在。 α 多样性指数分析表明, 湿心材群落多样性和物种分布均匀度高于正常材, 物种总数低于正常材。共现网络研究表明, 黑杨正常材细菌微生物之间存在较多的竞争和拮抗作用, 群落较不稳定, 湿心材细菌间存在更多的协同和互生关系, 微生物群落较稳定。关键微生物分析表明, 6年生黑杨湿心材中关键细菌微生物是 *Aquabacterium*、WCHB1-32 等, 6年生黑杨正常材中关键细菌微生物是 *Pleomorphomonas*、*Dysgonomonas*, 这些关键微生物在稳定湿心材微生物网络结构中发挥着重要作用。以上结果表明, 黑杨湿心材形成受多方面因素的影响, 是由微生物群落共同作用产生的结果。

关键词 黑杨; 湿心材; 高通量测序; 细菌; 微生物群落

中图分类号 S792.11 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)04-0221-09

杨树(*Populus* spp.)生长速度快、分布广, 是我国最重要的短周期工业用材林和防护林树种之一^[1]。杨树木材是一种重要的制浆造纸原料, 我国大部分企业都采用杨树木材制浆工艺生产纸浆, 同时杨树也是较好的胶合板用原材料^[2]。然而, 杨树湿心材病是一种难防治的枝干病害, 在国内外发生普遍, 且危害严重。杨树湿心材病变会使其组织理化性质发生改变^[3], 并表现出更高的水分含量、更深的颜色、腐烂的木材和恶臭的液体气味^[4], 给杨树的加工和利用带来十分不利的影

响。湿心材病主要是由微生物活动导致的, 宋春草等^[5]从杨树湿心材中分离出的杨柳欧文氏杆菌(*Brenneria salicis*)能导致被侵染的杨树植株出现典型湿心材症状, 王奎^[6]从杨树湿心材病株组织中分离出果胶杆菌属(*Pectobacterium* spp.), 经茎注射和茎割伤法接种能使杨树茎部产生典型的湿心病症状, 王明凤^[7]从杨树湿心材中分离出柳欧文氏杆菌

(*Brenneria salicis*)和胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*), 接种杨树茎后可引起湿心材病害。因此, 导致湿心材形成的致病菌是多样的。

微生物共生是影响植物健康和生态系统功能的主要因素之一^[8]。杨树湿心材病通常由病原微生物侵染所致, 也受到微生物共生影响, 同时还与环境、基因、树龄、地下水位等多种因素有关^[9]。研究表明, 杨树湿心材多发生在地下水位较高的环境中, 杨树湿心材部分由于含水量高往往处于一个厌氧的环境。湿心材的产生也会使杨树内部生化环境发生变化, 含水量增加, 营养物质下降, 不含或含有极少量氧气, 湿心材这种环境会对大多数微生物生长产生抑制作用, 同时杨树湿心材浸提物中存在的酚酸类化合物对微生物群落也有影响^[10]。有学者认为杨树湿心材和正常材的微生物成分存在差异, 这些差异反映了湿心材形成的原因。目前有关杨树湿心

收稿日期: 2024-04-23

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD2201202)

周靖钰, E-mail: zhjingyu06@163.com

通信作者: 张新叶, E-mail: 1641135733@qq.com

材微生物群落结构研究甚少, Yu等^[11]研究发现, 杨树湿心材与正常材之间细菌群落组成存在显著差异, 而真菌群落内没有观察到明显差异, 且木材化学性质与细菌属相对丰度显著相关。为此, 本研究选取6年生树龄的美洲黑杨(*Populus deltoides*)品种华石2号杨(*Populus deltoides* Bartr. 'Huashi 2')作为研究对象, 通过Illumina-MiSeq高通量测序对其湿心材和正常材进行微生物多样性分析, 以期对杨树湿心材的形成机制和防治方法提供有效指导。

表1 华石2号黑杨样品组织的生物学信息

Table 1 Biological information of sample tissue of *Populus deltoides* Bartr. 'Huashi 2'

样品编号 Sample number	木芯采集高度/m Height of wood core collection	木芯长度/cm Length of wood core	湿芯长度/cm Wet core length	病情等级 Disease severity
HS2-2017-1	1.3	17.9	9.3	3
HS2-2017-2	1.3	24.5	12.6	3
HS2-2017-3	1.3	21.0	9.5	3
HS2-2017-4	1.3	22.4	10.8	3
HS2-2017-5	1.3	26.5	17.0	5
HS2-2017-6	1.3	23.0	12.7	3
HS2-2017-7	1.3	22.0	11.0	3
HS2-2017-8	1.3	27.8	15.5	3

1.2 样品采集

于2022年10月21日, 在树高1.3 m处用5.0 mm直径的生长锥采取钻心取样法收集木芯, 取样时保持钻头与杨树树干垂直, 并测量样本树木芯长度、湿芯长度等指标, 随机选取8株取样。将取好的木材样品分别用密封管密封, 标记编号和日期, 迅速放在干冰中带回实验室冻存, 用于微生物高通量测序。

1.3 高通量测序

基因组DNA的提取和PCR扩增: 样本基因组DNA采用CTAB方法提取, 检测纯度和浓度后将DNA样本稀释至1 ng/ μ L。以稀释后的DNA样本为模板, 使用799F (5'-AACMGGATTAG-ATACCCKG-3') 和1193R (5'-ACGT-CATCCCCACCTTCC-3')引物对V5—V7区进行PCR扩增^[12-13]。PCR产物的混样和纯化: 对PCR产物进行电泳检测, 通过检测的PCR产物等量混合后再次电泳检测, 使用Qiagen公司提供的QIAquick Gel Extraction Kit胶回收试剂盒回收目的条带产物。

文库构建和上机测序: 使用TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit建库试剂盒进行文库构建, 利用Qubit和Q-PCR定量后, 使用Nova-Seq6000对合格文库上机测序。

1 材料与方法

1.1 试验材料

研究样本为湖北省林业科学研究院在江汉平原石首市南口镇栽培的华石2号黑杨(*Populus deltoides* Bartr. 'Huashi 2'), 采样的树龄为6年生, 随机选取8株树分别采集湿心材和正常材(表1)。

杨树湿心材病严重程度分为若干等级, 并以数值0、1、3、5代表等级, 按照湿芯占木芯总长度的比值来划分。0级: 0; 1级: 0~1/3; 3级: 1/3~2/3; 5级: 2/3~1。

1.4 数据分析

根据扩增区域的特征, 构建小片段文库, 并基于Illumina NovaSeq测序平台对文库进行双末端测序。经过Reads拼接过滤, 操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)聚类降噪, 对得到的有效数据进行物种注释和丰度分析, 以确定样本的物种组成, 并进行 α 多样性分析, 以挖掘样本间群落结构的差异及进行个性化分析和深度的数据挖掘。

OTU聚类和物种注释: 采用Uparse算法对所有样本的有效标签进行聚类, 按97%的一致性将序列聚类为OTUs, 筛选出OTUs中出现频率最高的序列为代表序列^[14]。对OTUs序列进行物种注释分析(设定阈值为0.8~1.0), 分析各样本的群落组成^[15]。使用MUSCLE软件进行多序列比对, 最后以样本中数据量最少的为标准进行均一化处理^[16]。

1.5 分子生态网络构建

使用MENAP和Cytoscape软件, 构建微生物网络。首先, 标准化属水平丰度, 获取属水平标准相对丰度(standardized relative abundances, SRA)。将属水平SRA矩阵提交MENAP, 构建微生物网络; 使用greedy modularity optimization确定模块(modules)。提交属水平SRA, 病情指数, 属水平注释信息表格,

采用 Cytoscape 3.7.2 对网络图进行可视化处理。细菌微生物网络由不同属(nodes)组成,属之间正或负相互作用用连接(edges)表示。

对所有样本进行相关性指数(斯皮尔曼相关系数 SCC 或皮尔森相关系数 PCC)计算,得到物种相互关系系数矩阵后,设置过滤条件得到共发生网络图。

2 结果与分析

2.1 病情指数分析

由表1样品组织的生物学信息可知,6年生华石2号黑杨(HS2-2017)的病情等级为3~5,病情指数为65.0。

2.2 黑杨湿心材与正常材 OTU 分布情况及微生物群落 Alpha 多样性

为进一步探究每个样本中细菌微生物多样性的相互关系,通过韦恩分析观察6年生华石2号黑杨湿心材、正常材的 OTU 数目组成相似性及重叠情况。湿心材和正常材样品共有的 OTU 数目为 502,不同样品中特有 OTU 表现为湿心材(HS17X)247个、正常材(HS17B)486个(图1)。6年生华石2号黑杨湿心材与正常材中微生物组成明显不同,正常材(HS17B)特有 OTU 数目最多。

微生物群落 Alpha 多样性可以体现微生物群

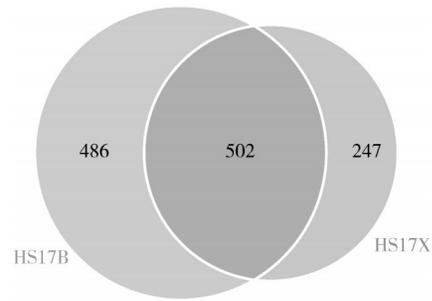


图1 黑杨湿心材与正常材韦恩图比较

Fig.1 Comparison of Venn diagrams of *Populus deltoides* wet heartwood and normal wood

落的多样性与丰富度。香农指数(Shannon index)代表样品中的分类总数及其占比,群落多样性越高,物种分布越均匀,Shannon 指数越大;辛普森指数(Simpson index)表征群落内物种分布的多样性和均匀度,Simpson 值越高,多样性越大。从表2可以看出,6年生华石2号黑杨湿心材和正常材微生物群落的 Shannon 指数与 Simpson 指数变化趋势类似,湿心材细菌群落的 Shannon 指数和 Simpson 指数都显著高于正常材($P < 0.05$),结果表明,黑杨湿心材群落多样性相比正常材较高,物种分布均匀度较好。Chao1 指数用来估计群落样品中包含的物种总数,由表2可知,湿心材群落细菌物种总数低于正常材,但没有显著性差异。

表2 湿心材和正常材微生物群落的 α 多样性

Table 2 Alpha diversity of microbial communities in wet heartwood and normal wood

样品 Sample	观察到的种类 Observed species	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	Chao1 指数 Chao1 index
HS17X	319.9±105.8a	3.89±1.09a	0.78±0.14a	383.7±120.8a
HS17B	379.1±173.5a	2.62±0.98b	0.57±0.20b	482.4±235.40a

注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。样品编号最后一个字母为X,代表湿心材;最后一个字母为B,代表正常材。Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The last letter of sample number is X, representing the wet heartwood; the last letter is B, representing normal wood.

2.3 华石2号黑杨细菌微生物群落分析

在属水平,选取丰度前10的微生物进行作图分析。由图2可知,在细菌属水平上,黑杨湿心材和正常材中劳尔氏菌属(*Ralstonia*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)2个属占据了超过24.6%的相对丰度,为优势菌属。对比湿心材与正常材的丰度,*Ralstonia*在湿心材中占比显著低于正常材($P < 0.05$),*Bacteroides*、多形单胞菌属(*Pleomorphomonas*)和氢孢菌属(*Hydrogenispora*)在湿心材中占比显著高于正常材($P < 0.05$)。拟杆菌属是革兰氏阴性、不形成孢子、厌氧和杆状细菌,在厌氧条件下发酵产生大量有机酸如乙

酸、异戊酸和琥珀酸^[17];多形单胞菌属也可以在厌氧的条件下产生 H_2 和 CO_2 ^[18],而 CO_2 也可以促进木材pH的进一步下降;*Hydrogenispora ethanolica* LX-BT可利用葡萄糖产乙酸、乙醇和 H_2 ^[19],这3种菌属可能是造成湿心材pH的下降以及腐臭味产生的重要因素。

利用样本的 OTU 丰度信息计算 Bray Curtis,并用主坐标分析(PCoA)法分析以上样本的细菌群落结构差异,发现 PC1 和 PC2 共同揭示了总群落的 46.19% 的差异,湿心材与正常材组内样本之间微生物细菌群落存在差异,2个组别样本之间细菌群落具

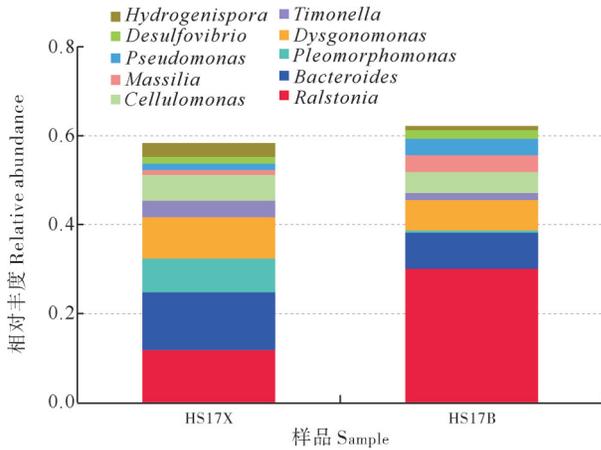


图2 细菌属水平上物种相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of species at the bacterial genus level

有一定的差异性(图3A)。基于ANOSIM组间差异

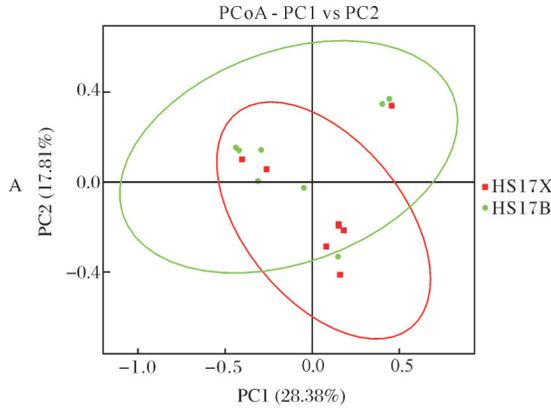


图3 黑杨湿心材与正常材细菌群落的主坐标分析(PCoA)(A)和NMDS分析(B)

Fig. 3 Principal coordinate analysis (PCoA) (A) and NMDS analysis (B) of bacterial communities of *Populus deltoides* wet heartwood and normal wood

HS17X 细菌网络和 HS17B 细菌网络的平均连通度分别为 3.654 和 3.291(表 3), 更高的连通度表明 HS17X 网络比 HS17B 网络更复杂。HS17X 细菌网络和 HS17B 细菌网络的平均路径距离分别为 3.288 和 3.920, 说明 HS17X 的节点在群落聚集程度更高。HS17X 网络的平均聚类系数为 0.147, 大于 HS17B 网络平均聚类系数, 说明 HS17X 的节点更紧密, HS17X 的细菌网络更为稳定和复杂。通过构建湿心材和正常材的分子生态网络, 发现湿心材细菌网络

检验的 NMDS 分析表明, 湿心材与正常材组别样本之间细菌 OTU ($R=0.32, P=0.004$) 存在极显著差异(图 3B)。

2.4 细菌相互作用网络及可视化分析

根据 16S 高通量测序的结果, 以接近的相似阈值 (St) 用于 HS17X (0.87) 和 HS17B (0.88) 细菌网络构建分析结果如图 4 所示, 湿心材 (HS17X) 和正常材 (HS17B) 细菌相互作用网络分别由 81 和 110 个节点以及 148 和 181 个连接组成。在 6 年生湿心材与正常材网络中, np(节点与其他节点存在负相互作用) 占比分别为 63.51% (94/148) 和 74.03% (134/181), 表明湿心材和正常材细菌网络中都存在较多的资源竞争和抑制作用, 湿心材细菌间存在更多的协同和互生关系, 湿心材网络相对较稳定。

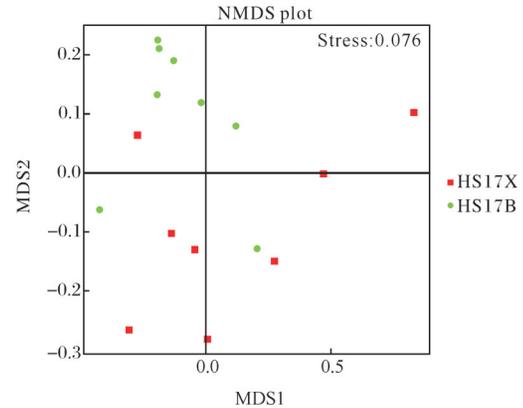


表3 6年生黑杨湿心材和正常材细菌网络的拓扑结构

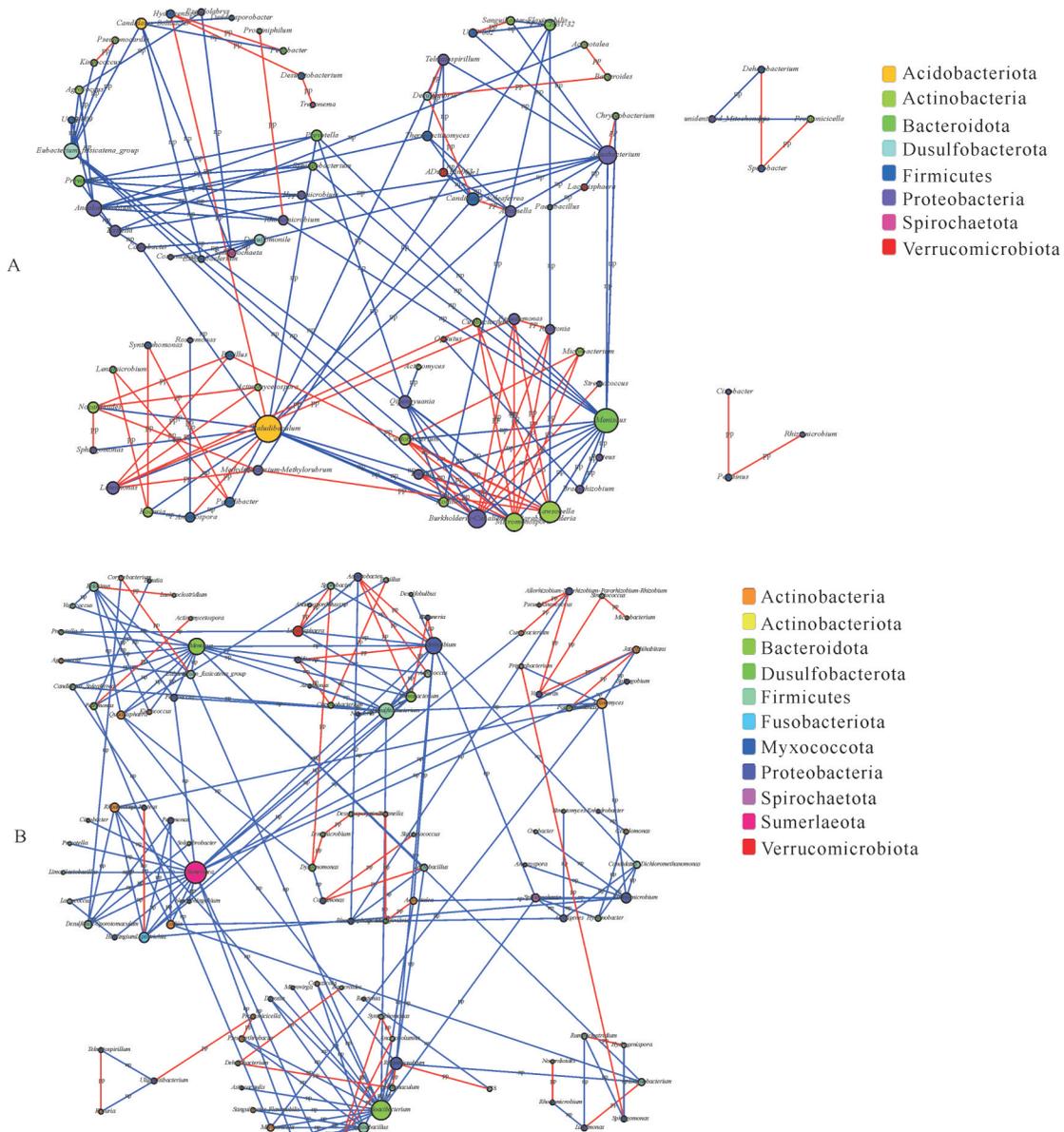
Table 3 Topology of the bacterial network in wet heartwood and normal wood of six-year-old *Populus deltoides* trees

群落 Communities	节点 Size	连接 Links	平均连通度 Average connectivity (avgK)	平均路径距离 Average path distance (GD)	平均聚类系数 Average clustering coefficient (avgCC)	模块化(模块数量) Modularity (Modules No.)
HS17X	81	148	3.654	3.288	0.147	0.555(8)
HS17B	110	181	3.291	3.920	0.133	0.589(11)

2.5 关键微生物分析

在微生物网络分析中, 用 Z_i 值和 P_i 值分别描述节点的模块内连通性和模块间连通性, 根据 Z_i 值和 P_i 值可以将节点分为: 外围节点 ($Z_i < 2.5$ 且 $P_i < 0.62$)、

表现出极其复杂的互作关系, 其相互作用机制还需要进一步研究, 而正常材细菌互作则显得相对简单, 这可能是湿心材内部细菌共同促进植物对营养物质的吸收和防御病原物的入侵, 经过长期相互作用, 形成了相比于正常材较稳定的网络环境。



不同节点代表不同属,节点大小代表该属的平均相对丰度,相同门的节点颜色相同,节点之间的连线的粗细与物种互作的相关系数绝对值正相关,连线颜色和相关性的正负对应(红色正相关,蓝色负相关)。Different nodes represent different genera, node size represents the average relative abundance of the genus, nodes of the same phylum are of the same color, the thickness of the connecting lines between the nodes is positively correlated with the absolute value of correlation coefficients of the species interactions, and the color of the connecting lines corresponds to the positive and negative of the correlation (red is positively correlated, blue is negatively correlated).

图4 湿心材(A)和正常材(B)细菌相互作用网络分析

Fig. 4 Bacterial interaction network analysis in wet heartwood (A) and normal wood (B)

连接器($Z_i < 2.5$ 且 $P_i > 0.62$)、模块集线器($Z_i > 2.5$ 且 $P_i < 0.62$)和网络集线器($Z_i > 2.5$ 且 $P_i > 0.62$)。在分子生态网络拓扑结构中,不同节点的拓扑角色可以作为识别关键微生物的依据,根据Deng等^[20]研究结果, $Z_i \geq 2.5$ 或 $P_i \geq 0.62$ 的节点被定义为关键物种,这些微生物在各自的大模块中起着联系模块内部微生物的重要作用。从图5和表4中可以看出,在6年

生黑杨湿心材中发挥关键作用的细菌主要为变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteriota)、拟杆菌门(Bacteroidota)和放线菌门(Actinobacteria)。其中,关键微生物WCHB1-32参与秸秆难降解组分如木质素的分解,是木质素的潜在降解菌^[21],由此推测,WCHB1-32可能参与了湿心材中木质素的降解。

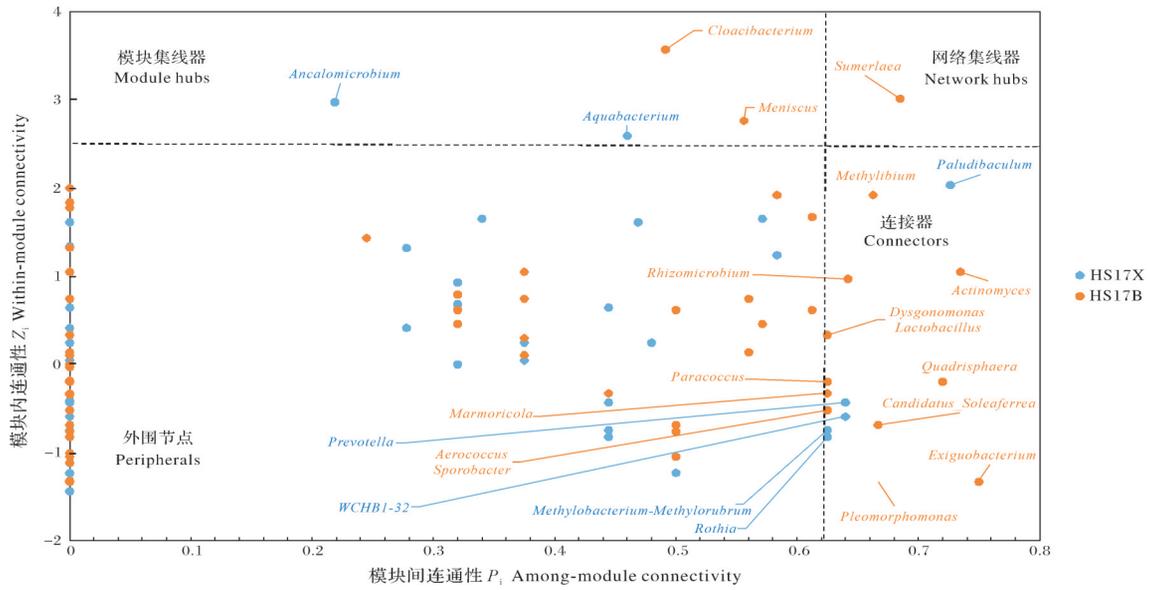


图 5 6 年生黑杨湿心材和正常材细菌关键微生物分析

Fig. 5 Key microbiological analysis of bacteria in wet heartwood and normal wood of six-year-old *Populus deltoides*

从图 5 和表 4 可以看出,在 6 年生正常材中发挥关键作用的细菌主要为 Bacteroidota、Sumerlaeota、Proteobacteria、Actinobacteria 和厚壁菌门 (Firmicutes)。6 年生正常材关键微生物中, *Pleomorphomonas* 多为植物病原菌,可以在厌氧的条件下产生氢气和二氧化碳^[18]。 *Dysgonomonas* 也是厌氧条

表 4 细菌网络的关键微生物

Table 4 Keystone taxa in the bacterial networks

样品 Sample	门 Phylum	科 Family	属 Genus
HS17X	Proteobacteria	Ancalomicrobiaceae	<i>Ancalomicrobium</i>
HS17X	Proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Aquabacterium</i>
HS17X	Acidobacteriota	Acidobacteriae	<i>Paludibaculum</i>
HS17X	Bacteroidota	Prevotellaceae	<i>Prevootella</i>
HS17X	Bacteroidota	Prolixibacteraceae	WCHB1-32
HS17X	Proteobacteria	Beijerinckiaceae	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>
HS17X	Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Rothia</i>
HS17B	Bacteroidota	Weeksellaceae	<i>Cloacibacterium</i>
HS17B	Sumerlaeota	Sumerlaeaceae	<i>Sumerlaea</i>
HS17B	Bacteroidota	Prolixibacteraceae	<i>Meniscus</i>
HS17B	Proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Methylibium</i>
HS17B	Actinobacteria	Cellulomonadaceae	<i>Actinotalea</i>
HS17B	Proteobacteria	Micropepsaceae	<i>Rhizomicrobium</i>
HS17B	Bacteroidota	Dysgonomonadaceae	<i>Dysgonomonas</i>
HS17B	Firmicutes	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>
HS17B	Proteobacteria	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i>
HS17B	Actinobacteria	Kineosporiaceae	<i>Quadrisphaera</i>
HS17B	Actinobacteria	Nocardiodaceae	<i>Marmoricola</i>
HS17B	Firmicutes	Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i>
HS17B	Firmicutes	Oscillospiraceae	<i>Sporobacter</i>
HS17B	Firmicutes	Ruminococcaceae	<i>Candidatus_Soleaferrea</i>
HS17B	Proteobacteria	Pleomorphomonadaceae	<i>Pleomorphomonas</i>
HS17B	Firmicutes	Exiguobacteraceae	<i>Exiguobacterium</i>

注:关键微生物顺序按照 Z_i 值从大到小排列。Note: The order of key microorganisms is arranged in descending order of Z_i value.

件下营发酵细菌,并且在6年生黑杨正常材和湿心材都占据了超过6.84%的相对丰度(图2)。研究者发现,在白蚁后肠中该属也是优势微生物,在*D. macrotermitis*基因组中有多个木质纤维素降解酶基因,且具备完整的木质纤维素降解和乙酸、乳酸生成通路^[22],这符合杨树发生湿心材的特征,即木质纤维素被降解而产生有机酸导致木材的酸化。有研究表明,*Marmoricola*(栖大理石雕菌属)是潜在有益菌,可以促进作物生长,提高作物抵抗病害的能力,具有较大的应用潜力^[23]。

3 讨论

本研究以6年生华石2号黑杨为材料,研究湿心材与正常材细菌微生物群落比较。湿心材的发生既与杨树本身生长快速的特性相关,也与杨树所处的生态环境如地下水位较高相关。究其原因,湿心材就是在这样的条件下,由于杨树木质部微生物的作用,最终导致杨树木质部腐烂变质的现象。湿心材的发生,除了已经报道的某些病原微生物的侵染^[5-6],我们推测湿心材的发生应该是杨树在厌氧条件下体内微生物相互作用的结果。

本研究通过 α 多样性指数分析和构建6年生华石2号黑杨湿心材和正常材微生物网络分析图发现,湿心材物种总数低于正常材,表明许多微生物在湿心材中生存受到抑制。大多数研究报道,湿心材的产生会使杨树内部生化环境发生变化,心材含水量远高于边材,营养物质下降,不含氧气或氧气很少^[9],湿心材这种环境会抑制大多数微生物生长。植物在受到病原菌侵染时会分泌大量的酚酸类化合物来抵御病原菌侵染,这些酚酸类物质会通过损伤植物细胞膜以及破坏其他生化过程对植物造成危害^[24],会抑制某些细菌生长,导致微生物总数下降,这与本研究结论相符。

本研究分析了丰度最高的10个细菌属,其中*Ralstonia*为优势菌属且多为植物病原菌^[25],推测*Ralstonia*可能和湿心材的发生有关。*Bacteroides*、*Pleomorphomonas*、*Hydrogenispora*等都是厌氧细菌,在厌氧条件下发酵产生大量有机酸如乙酸、异戊酸和琥珀酸^[17-19],可能是造成木材pH的下降以及腐臭味产生的重要因素。微生物通过相互作用构成微生物网络,共同维持群落的稳定性^[26]。6年生华石2号黑杨湿心材与正常材中维持微生物网络的关键细菌微生物有所区别,大多数是植物病原菌(例如*Pleo-*

morphomonas)、可能改变环境(如pH)的菌株(例如*Pleomorphomonas*、*Dysgonomonas*、WCHB1-32)和促进植物生长的有益菌(例如*Marmoricola*),这些菌株通过协同、拮抗等相互作用共同参与了湿心材的形成并被湿心材内部环境所影响。本研究发现微生物网络中6年生黑杨湿心材比6年生黑杨正常材微生物群落稳定,湿心材细菌网络表现出及其复杂的互作关系,能否通过促进或抑制某些关键微生物生长,以达到改变杨树湿心材理化性质,提高杨树质量的目的,仍需进一步研究。

参考文献 References

- [1] 晁龙军,龚益鸿,郭先梅,等.湖北省杨树湿心材发生及危害的调查研究[J].湖北林业科技,1997,26(2):13-15. CHAO L J, GONG Y H, GUO X M, et al. Investigation and study on the occurrence and harm of poplar wet heartwood in Hubei Province [J]. Hubei forestry science and technology, 1997, 26(2):13-15 (in Chinese).
- [2] 黎云昆.我国杨树人工用材林与人造板工业发展思考[J].林业经济,2010,32(7):36-40. LI Y K. On China poplar artificially timber and man-made industrial development [J]. Forestry economics, 2010, 32(7):36-40 (in Chinese with English abstract).
- [3] 诸葛强,黄敏仁,潘惠新,等.杨树湿心材的化学特性及形成机理研究[J].林业科学,1997,33(3):259-266. ZHUGE Q, HUANG M R, PAN H X, et al. Study on chemical characteristics and formation mechanism of poplar wet heartwood [J]. Scientia silvae sinicae, 1997, 33(3):259-266 (in Chinese).
- [4] ZHANG Q L, HU X Y, HU Q, et al. Factors affecting poplar wetwood characteristics [J]. Journal of forestry research, 2023, 34(5):1615-1626.
- [5] 宋春草,梅莉,蔡丽,等.杨树湿心材致病细菌及其拮抗细菌的鉴定[J].西南林业大学学报(自然科学),2018,38(6):134-144. SONG C C, MEI L, CAI L, et al. Identification of pathogen bacteria and antagonistic bacteria of wet-heart wood disease in *Populus* [J]. Journal of southwest forestry university (natural sciences), 2018, 38(6):134-144 (in Chinese with English abstract).
- [6] 王奎.杨树湿心病致病菌的侵染途径及其对杨树生长的影响[D].武汉:华中农业大学,2015. WANG K. The infection way of wetwood disease pathogens of poplar and their effects on the growth of poplar [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [7] 王明凤.两种杨树湿心材致病菌致病机理研究[D].武汉:华中农业大学,2020. WANG M F. Study on the pathogenic mechanism of two poplar wetwood disease pathogens [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese with

- English abstract).
- [8] VAN DER HEIJDEN M G A, BARDGETT R D, VAN STRAALLEN N M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems [J]. *Ecology letters*, 2008, 11(3): 296-310.
- [9] 李明月, 段洪南, 吴振强, 等. 2种杨树湿心材化学成分分析 [J]. *西北林学院学报*, 2018, 33(4): 211-214. LI M Y, DUAN H N, WU Z Q, et al. Chemical composition of the wetwoods of two kinds of poplar species [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2018, 33(4): 211-214 (in Chinese with English abstract).
- [10] 祖勃荪. 国外对杨树湿心材的研究 [J]. *林业科学*, 2000, 36(5): 85-91. ZU B S. Foreign studies on wet heart wood of poplars [J]. *Forestry science*, 2000, 36(5): 85-91 (in Chinese with English abstract).
- [11] YU X L, HU X Y, PENG Y J, et al. Amplicon sequencing reveals different microbial communities in living poplar wetwood and sapwood [J]. *Trees*, 2019, 33(3): 851-865.
- [12] 曹毅, 陆宁, 陈兴江, 等. 烟草青枯病病圃土壤细菌组成的高通量测序分析 [J]. *河南农业科学*, 2017, 46(3): 81-85. CAO Y, LU N, CHEN X J, et al. Pyrosequencing analysis of soil bacteria composition in tobacco bacterial wilt disease nursery [J]. *Journal of Henan agricultural sciences*, 2017, 46(3): 81-85 (in Chinese with English abstract).
- [13] 常安然, 李佳, 张耸, 等. 基于宏基因组学 16S rDNA 测序对烟草根际土壤细菌群落组成分析 [J]. *中国农业科技导报*, 2017, 19(2): 43-50. CHANG A R, LI J, ZHANG S, et al. Analysis of bacterial community structure in rhizosphere soil of tobacco based on the metagenomics 16S rDNA sequencing technology [J]. *Journal of agricultural science and technology*, 2017, 19(2): 43-50 (in Chinese).
- [14] HAAS B J, GEVERS D, EARL A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons [J]. *Genome research*, 2011, 21(3): 494-504.
- [15] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nature methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [16] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. *Nucleic acids research*, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [17] 黄俊杰, 陆雅海. 土壤拟杆菌与梭菌分解多糖类有机物质的研究进展与展望 [J]. *微生物学通报*, 2022, 49(3): 1147-1157. HUANG J J, LU Y H. Decomposition of soil polymeric organic matter by *Bacteroidetes* and *Clostridia*: progress and perspectives [J]. *Microbiology China*, 2022, 49(3): 1147-1157 (in Chinese with English abstract).
- [18] ESQUIVEL-ELIZONDO S, DELGADO A G, KRAJMALNIK-BROWN R. Evolution of microbial communities growing with carbon monoxide, hydrogen, and carbon dioxide [J/OL]. *FEMS microbiology ecology*, 2017, 93(6): fix076 [2024-04-23]. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix076>.
- [19] LIU Y, QIAO J T, YUAN X Z, et al. *Hydrogenispora ethanolica* gen. nov., sp. nov., an anaerobic carbohydrate-fermenting bacterium from anaerobic sludge [J]. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2014, 64(Pt 5): 1756-1762.
- [20] DENG Y, JIANG Y H, YANG Y F, et al. Molecular ecological network analyses [J/OL]. *BMC bioinformatics*, 2012, 13: 113 [2024-04-23]. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-113>.
- [21] JI Y, LIU P F, CONRAD R. Response of fermenting bacterial and methanogenic archaeal communities in paddy soil to progressing rice straw degradation [J]. *Soil biology and biochemistry*, 2018, 124: 70-80.
- [22] 孙新新, 未建华, 李净净, 等. 黄翅大白蚁后肠优势菌大白蚁营发醇菌的全基因组序列分析 [J]. *微生物学报*, 2018, 58(6): 995-1003. SUN X X, WEI J H, LI J J, et al. Whole-genome analysis of the dominant bacterium *Dysgonomonas macrotermis* in the hindgut of *Macrotermes barneyi* [J]. *Acta microbiologica sinica*, 2018, 58(6): 995-1003 (in Chinese with English abstract).
- [23] 桂莎, 刘芳, 张立丹, 等. 复合菌剂防控香蕉枯萎病的效果及其微生物学机制 [J]. *土壤学报*, 2020, 57(4): 995-1007. GUI S, LIU F, ZHANG L D, et al. Effects of complex anti-fungal agents biocontrolling *Fusarium* wilt on banana and its microbiological mechanism [J]. *Acta pedologica sinica*, 2020, 57(4): 995-1007 (in Chinese with English abstract).
- [24] 窦志扬, 任改, 苗德志, 等. 土壤酚酸胁迫对杨树光合效率参数的影响 [J]. *中国水土保持科学(中英文)*, 2022, 20(5): 47-55. DOU Z Y, REN G, MIAO D Z, et al. Effects of soil phenol stress on the photosynthetic efficiency parameters of poplar [J]. *Science of soil and water conservation*, 2022, 20(5): 47-55 (in Chinese with English abstract).
- [25] 方启航, 颜顾浙, 方伟, 等. 草酸青霉和棘孢木霉对青枯劳尔氏菌的生防效果 [J]. *浙江农林大学学报*, 2022, 39(4): 852-859. FANG Q H, YAN G Z, FANG W, et al. Biocontrol effect of *Penicillium oxalicum* and *Trichoderma asperellum* on *Ralstonia solanacearum* [J]. *Journal of Zhejiang A & F University*, 2022, 39(4): 852-859 (in Chinese with English abstract).
- [26] LAYEGHIFARD M, HWANG D M, GUTTMAN D S. Disentangling interactions in the microbiome: a network perspective [J]. *Trends in microbiology*, 2017, 25(3): 217-228.

Analyzing structure of bacterial and microbial community in wet heartwood of *Populus deltoides* Bartr in Jiangnan Plain

ZHOU Jingyu¹, HUANG Guowei², ZHANG Yadong², QI Gaofu¹, ZHANG Xinye²

1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Academy of Forestry Sciences, Wuhan 430079, China

Abstract The wet heartwood and normal wood of 6-year-old *Populus deltoides* Bartr. ‘Huashi2’ in the Jiangnan Plain were used to study the role of bacterial and microbial communities in the pathogenesis in the wet heartwood of *Populus*. High-throughput sequencing was used to sequence the V5-V7 region of the 16S rRNA gene. The results of sequencing were analyzed with bioinformatics. Methods including principal component analysis, α -diversity index analysis, and microbial network analysis were used to study the differences in the structure and composition of the bacterial and microbial communities in the wet heartwood and normal wood of 6-year-old *Populus deltoides* Bartr. The results of principal component analysis showed that the bacterial abundance of the genera *Ralstonia* and *Bacteroides* was the highest, while the proportion of the genera *Bacteroides*, *Pleomorphomonas* and *Hydrogenispora* in wet heartwood was significantly higher than that in normal wood ($P < 0.05$) at the genus level of the bacterial and microbial communities in the wet heartwood and normal wood of 6-year-old *Populus deltoides* Bartr. The results of analyzing the functions of microbial communities showed that *Ralstonia* were mostly phytopathogenic bacteria, which widely existed in wet heartwood. The results of analyzing the alpha diversity index showed that the diversity and species distribution uniformity of the community in the wet heartwood were higher than those in the normal wood, and the total number of species in the wet heartwood was lower than that in the normal wood. The results of analyzing the co-occurrence network showed that there was a lot of competition and antagonism between bacteria and microorganisms in the normal wood of *Populus deltoides* Bartr, and the community was relatively unstable. There were more synergistic and mutualistic relationships among bacteria in wet heartwood, and the microbial community was relatively stable. The results of analyzing key microorganisms showed that the key bacterial microorganisms in the wet heartwood of 6-year-old *Populus deltoides* Bartr. were *Aquabacterium*, WCHB1-32, etc., and the key bacterial microorganisms in the normal heartwood of 6-year-old *Populus deltoides* Bartr. were *Pleomorphomonas*, *Dysgonomonas*, etc. These key microorganisms played an important role in stabilizing the structure of microbial network in the wet heartwood. It is indicated that the formation of wet heartwood in *Populus deltoides* Bartr. is affected by multiple factors and is the result of the joint action of microbial communities.

Keywords *Populus deltoides* Bartr; wet heartwood; high-throughput sequencing; bacteria; microbial community

(责任编辑:葛晓霞)