

吉泽, 肖关丽, 陈斌, 等. 干旱胁迫对马铃薯叶片内生细菌组成和结构的影响[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(1): 79-88.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.01.009

干旱胁迫对马铃薯叶片内生细菌组成和结构的影响

吉泽¹, 肖关丽¹, 陈斌², 李俊逸¹, 姚遥¹, 祝春月¹, 杨金睿¹

1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201; 2. 云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201

摘要 为解析马铃薯应对干旱胁迫的响应机制, 采用 Illumina Novaseq 测序技术, 对干旱胁迫下马铃薯叶片中的内生细菌 16S rRNA 进行高通量测序, 研究干旱胁迫下马铃薯叶片内生细菌组成及多样性的变化。结果显示, 在正常浇水和干旱胁迫下马铃薯叶片分别获得 1 548 和 2 006 条分类序列, 其中正常浇水下特有 OTU 有 287 个, 干旱处理下特有 OTU 有 769 个。在干旱胁迫下, 内共生菌 *candidatus Portiera* 和杀雄菌属 *Arsenophonus* 的丰度较正常浇水下减低了 95.9% 和 68.1%, 拟杆菌门 *Muribaculaceae* 拟杆菌目 *Bacteroidales*、毛螺菌属 (*Lachnospira*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、毛螺菌科 NK4A136 群 (*Lachnospiraceae_NK4A136_group*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*) 在干旱处理较正常浇水下分别提高了 203.8%、152.4%、81.8%、89.7%、285.6%、1 428.0%、112.0% 和 148.4%; Shannon 指数和 Simpson 指数均在干旱胁迫下显著高于正常浇水处理, ACE 指数和 Chao1 指数在干旱胁迫和正常浇水下无显著差异。结果表明, 干旱胁迫能影响马铃薯内生细菌群落结构组成, 干旱胁迫下富集了内生优势菌门放线菌门和厚壁菌门, 同时伯克霍尔德氏科细菌相对丰度增加, 可能是马铃薯应对干旱胁迫作出的积极响应。

关键词 马铃薯; 内生细菌; 干旱胁迫; 微生物群落; 高通量测序

中图分类号 S532; S182 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)01-0079-10

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是重要的粮菜兼用作物, 其产量位居世界第四, 仅次于稻米、小麦和玉米, 是全球最便宜、最容易获得的蛋白质、必需氨基酸、碳水化合物、矿物质、抗氧化剂和维生素的来源^[1]。马铃薯在应对气候变化、食物生产、营养健康、农业资源的合理与持续利用方面具有重要的战略地位^[2], 需要大力发展马铃薯生产。而水资源的匮乏, 使马铃薯生产遭到严峻考验, 许多发展中国家的马铃薯产区位于半干旱地区, 干旱造成马铃薯大面积减产, 从而威胁到农业的可持续性^[3-5]。

迄今为止, 为缓解干旱胁迫对植物生长和产量造成的影响, 研究人员已经通过各种途径培育耐旱品种, 常规育种和基因工程方法被用于创制耐旱和高产品种。然而, 传统育种要耗费大量的人力物力以及时间, 甚至可能会丢失其他的有益性状; 利用基因工程育种在理论上速度会更快, 但是研究转基因作物同样也面临着时间和劳动力的挑战。此外, 由于消费者对转基因植物的产品存在芥蒂, 不能保证

转基因食品会在市场获得成功。植物-微生物的相互作用可以影响植物对干旱胁迫的反应^[6-7]。因此, 揭示内生细菌在植物抗旱性中的作用是非常重要的。

植物内生细菌存在于其根、叶和茎等组织中^[8-9], 在植物生长、增强对生物和非生物胁迫的耐受性和次生代谢物方面发挥着关键作用^[10-11]。据报道, 在干旱胁迫下将内生细菌 *Bacillus pumilus* 接种于甘草, 甘草植株根长增加, 过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性提高, 丙二醛 (MDA) 含量下降^[12], Gagne-Bourgue 等^[13]将倾草叶片内生细菌 *Bacillus subtilis* 接种于 *Brachypodium distachyon*, 植株地上部和地下部生物量、可溶性糖含量和淀粉含量增加, 干旱反应基因上调表达。与其他作物相比, 马铃薯对干旱胁迫更为敏感, 干旱的发生, 特别是在早期块茎形成期间, 会影响块茎的数量和质量从而影响马铃薯的产量^[14-15]。为确保马铃薯的可持续生产, 植物育种者

收稿日期: 2022-09-23

基金项目: 云南省重大科技专项 (2019ZG00902)

吉泽, E-mail: jzllxt0504@163.com

通信作者: 肖关丽, E-mail: glxiao9@163.com

面临着培育高产、抵御生物和非生物胁迫品种的挑战^[16]。利用微生物来缓解干旱胁迫对作物产生的不利影响将会是一种新的途径。然而,对于干旱胁迫下马铃薯内生细菌群落组成结构的研究鲜有报道。因此,研究干旱胁迫下马铃薯叶片内生细菌的多样性和组成,可以为内生细菌途径改善马铃薯对于干旱胁迫的耐受性提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 供试马铃薯品种

丽薯6号,由云南省会泽县农技中心提供,为耐旱中间型品种^[17-18]。

1.2 马铃薯的种植及管理

本研究采用温室盆栽法,土壤为云南农业大学后山试验田的红壤土,盆栽所用塑料花盆高23 cm,外径30 cm,底部有孔,装土前在花盆底部铺合适大小的纱布,以防土壤从底部的孔流失和害虫进入土壤内对根系造成危害。将花盆内的土浇水至土壤饱和和含水量,即开始播种。选取发育良好、芽体饱满、大小基本一致、具有1个顶芽种薯薯块种植在塑料盆内,每盆定植1株,每个处理3次重复,播种前将马铃薯种薯表面用无菌水冲洗干净,用1%的次氯酸钠溶液消毒10 min,70%的乙醇浸泡30 s后立刻除去乙醇,无菌水冲洗5次,避光晒干后播种^[19]。播种在土层约7 cm深处,出苗后10 d进行胁迫处理。

1.3 干旱胁迫处理

以土壤水分占最大持水量的75%~80%为正常浇水对照组(CK),以土壤水分占最大持水量的40%~45%为干旱胁迫处理(D)^[20]。在种植前,用环刀法测定土壤最大持水量,种植过程中每隔2 d用土壤水分温度测定仪(Takeme-10)监测土壤水分,并根据土壤最大持水量及时补充水分。

1.4 样品采集与预处理

马铃薯块茎形成期进行取样,取健康马铃薯植株顶叶下完全展开的第4片复叶。

将采集的样品用流水冲洗1~2 h,无菌滤纸擦干样品表面的水分,然后用无菌水漂洗3次,75%乙醇浸泡1 min,无菌水漂洗3次,3% NaClO溶液浸泡1 min,无菌水漂洗3次,75%乙醇中浸泡30 s,无菌水漂洗3次^[21]。吸取最后1次漂洗液涂布于LB和PDA平板上作为空白对照,与其他平板相同条件培养,验证表面消毒是否彻底。将处理合格的叶片样品送往北京百迈客生物科技有限公司进行16S

rRNA 基因高通量测序。

1.5 总DNA提取及16S rRNA基因序列扩增

样品总基因组DNA提取根据PowerSoil DNA分离试剂盒(MO BIO Laboratories)操作流程进行。选用通用引物338F(5'-ACTCCTACGGGAG-GCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3')扩增16S rRNA V3~V4区,PCR扩增和后续分析在Illumina Novaseq测序平台上进行。

1.6 序列处理与分析

微生物多样性是基于Illumina Novaseq测序平台,利用双末端测序(paired-end)的方法,构建小片段文库进行测序。通过对Reads拼接过滤,聚类或去噪,根据2021年42个原核生物门级别拉丁名称的重要修订^[22],进行物种注释(相似性 $\geq 97\%$)及丰度分析,可以揭示样品的物种构成;进一步进行 α 多样性分析(alpha diversity)、 β 多样性分析(beta diversity)、显著物种差异分析,评估干旱胁迫对马铃薯叶片内生细菌的群落结构和多样性的影响,采用SPSS 24.0软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 测序结果及OTUs丰度

由表1可见,正常浇水处理下马铃薯叶片种群共获得438 081条有效tags,聚类获得1 548个OTUs,共注释到细菌26门62纲157目273科553属611种;干旱处理下马铃薯叶片种群共获得397 772条有效tags,聚类获得2 006个OTUs,共注释到细菌30门72纲181目340科653属730种。由此可知,正常浇水处理下马铃薯叶片种群获得的OTU数量少于干旱处理下马铃薯叶片种群,注释到的叶片内生细菌种属少于干旱处理下马铃薯叶片种群。

2.2 物种丰度及群落组成结构

由图1可见,在门分类水平上,正常浇水处理下与干旱处理下马铃薯叶片内生细菌丰度前10的细菌菌主要是变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、Epsilonbacteraeota和螺旋菌门(Spirochaetes)。其中,正常浇水处理下马铃薯叶片内生细菌种群相对丰度由高到低排序为变形菌门(75.75%)>厚壁菌门(12.45%)>拟杆菌门(3.73%)>放线菌门(2.36%)>酸杆菌门(1.69%)>蓝细菌门

表 1 马铃薯叶片内生细菌测序基本信息

Table 1 Sequencing basic information of endophytic bacteria in potato leaves

分组情况 Group information	有效条带/条 Effective tags	OTU 数 Number of OTUs	不同分类阶元归类数量 Number of different taxonomic rank					
			门 Pylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species
CK	438 081±19 626.51a	1 548±227.59a	26±0.58b	62±6.14a	157±11.02a	273±21.51b	553±49.00a	611±58.59a
D	397 772±21 909.64a	2 006±337.20a	30±2.08a	72±5.13a	181±12.66a	340±30.66a	653±64.83a	730±81.35a

注:表中不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著。下同。Note:Different letters in the table indicate significant differences at 0.05 level among treatments.The same as below.

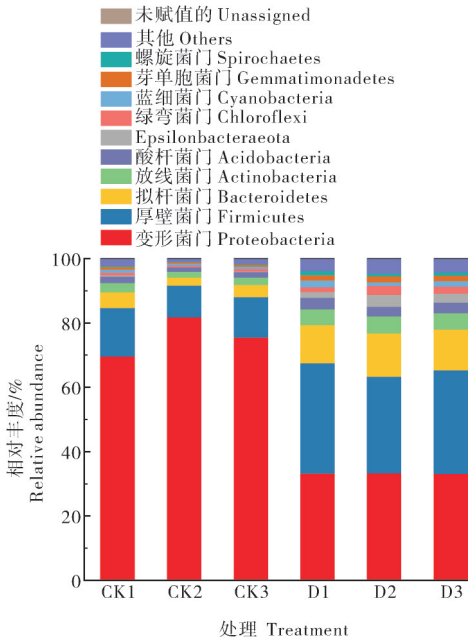


图 1 干旱胁迫下马铃薯叶片内生细菌在门水平上的组成情况

Fig. 1 Composition of endophytic bacteria in potato leaves under drought stress at the phylum level

(0.78%)>绿弯菌门(0.70%)>芽单胞菌门(0.56%)>螺旋菌门(0.24%)>Epsilonbacteraeota(0.22%);干旱胁迫处理下马铃薯叶片内生细菌种群相对丰度由高到低排序为变形菌门(33.32%)>厚壁菌门(32.16%)>拟杆菌门(12.70%)>放线菌门(5.03%)>酸杆菌门(3.30%)>Epsilonbacteraeota(2.76%)>绿弯菌门(2.16%)>芽单胞菌门(1.75%)>蓝细菌门(1.64%)>螺旋菌门(1.00%);由此可知,在门水平上,正常浇水与干旱处理下马铃薯叶片内生细菌的优势菌门均为变形菌门。干旱胁迫后马铃薯叶片内生细菌相对丰度在门水平发生了变化,其中变形菌门降低 56.0%,其余菌门相对丰度均成倍提高,尤其 Epsilonbacteraeota 丰度提高了 11.3 倍。

在纲水平上(图 2),正常浇水与干旱处理下马铃薯叶片内生细菌丰度前 10 的菌纲主要是 γ -变形菌纲

(Gammaproteobacteria)、梭菌纲(Clostridia)、 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、拟杆菌纲(Bacteroidia)、杆菌纲(Bacilli)、 δ -变形菌纲(Deltaproteobacteria)、放线菌纲(Actinobacteria)、嗜酸杆菌纲(Acidobacteria)、生氧光菌纲(Oxyphotobacteria)和弯曲菌纲(Campylobacteria)。其中,正常浇水处理下马铃薯叶片内生细菌种群相对丰度由高到低排序为 γ -变形菌纲(69.89%)>梭菌纲(8.75%)> α -变形菌纲(4.27%)>拟杆菌纲(3.53%)>杆菌纲(3.24%)> δ -变形菌纲(1.58%)>放线菌纲(1.48%)>嗜酸杆菌纲(1.46%)>生氧光菌纲(0.78%)>弯曲菌纲(0.22%);干旱胁迫处理下马铃薯叶片内生细菌种群相对丰度由高到低排序为梭菌纲(23.67%)> γ -变形菌纲(17.57%)>拟杆菌纲(12.29%)> α -变形菌纲(11.69%)>杆菌纲(7.21%)> δ -变形菌纲(4.00%)>放线菌纲(3.07%)>弯曲菌纲(2.76%)>

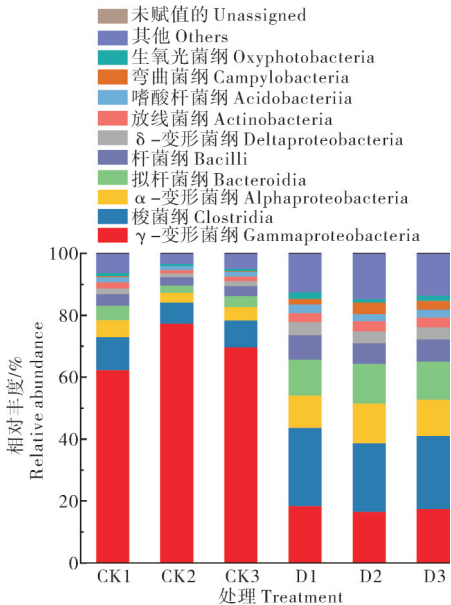


图 2 干旱胁迫下马铃薯叶片内生细菌在纲水平上的组成情况

Fig. 2 Composition of endophytic bacteria in potato leaves at the class level under drought stress

嗜酸杆菌纲(2.59%)>生氧光菌纲(1.62%)。由此可知,在纲水平上,正常浇水与干旱胁迫处理下马铃薯叶片内生细菌的优势菌纲分别为 γ -变形菌纲和梭菌纲。干旱胁迫后马铃薯叶片内生细菌在纲水平 γ -变形菌纲相对丰度降低74.9%,其余菌纲相对丰度均显著增加,特别是弯曲菌纲相对丰度增加了1 133.84%。

在目水平上(图3),正常浇水处理下与干旱处理下马铃薯叶片内生细菌丰度前10的菌主要是海洋螺菌目(Oceanospirillales)、梭菌目(Clostridiales)、拟杆菌目(Bacteroidales)、乳酸杆菌目(Lctobacillales)、根瘤菌目(Rhizobiales)、肠杆菌(目 Enterobacteriales)、 β -变形菌目(Betaproteobacteriales)、曲杆菌目(Campylobacteriales)、脱硫弧菌目(Desulfovibrionales)、索利氏菌目(Solibacterales)。其中,正常浇水处理下马铃薯叶片内生细菌种群相对丰度由高到低排序为海洋螺菌目(62.91%)>梭菌目(8.75%)>肠杆菌目(3.58%)>拟杆菌目(2.93%)>乳酸杆菌目(2.72%)>根瘤菌目(2.11%)> β -变形菌目(1.96%)>索利氏菌目(0.88%)>脱硫弧菌目(0.78%)>曲杆菌目(0.22%);干旱胁迫处理下马铃薯叶片内生细菌种群相对丰度由高到低排序为梭菌目(23.65%)>拟杆菌目(10.00%)>根瘤菌目(5.97%)>乳酸杆菌目(5.72%)> β -变形菌目

(5.44%)>肠杆菌目(4.41%)>弯曲杆菌目(2.76%)>海洋螺菌目(2.69%)>脱硫弧菌目(2.11%)>索利氏菌目(1.84%)。结果表明,在目水平上正常浇水处理与干旱胁迫处理下马铃薯叶片内生细菌的优势菌目分别为海洋螺菌目和梭菌目,干旱胁迫后马铃薯叶片内生细菌海洋螺菌目相对丰度降低95.7%,其余菌目相对丰度均成倍增加。

在科水平上(图4),正常浇水处理下与干旱胁迫下马铃薯叶片内生细菌丰度前十的菌科主要是盐单胞菌科 Halomonadaceae、毛螺菌科 Lachnospiraceae、瘤胃菌科 Ruminococcaceae、肠杆菌科 Enterobacteriaceae、Muribaculaceae、伯克霍尔德氏菌科 Burkholderiaceae、根瘤菌科 Rhizobiaceae、脱硫弧菌科 Desulfovibrionaceae、乳杆菌科 Lactobacillaceae、普雷沃氏菌科 Prevotellaceae。其中,正常浇水处理下马铃薯叶片内生细菌种群相对丰度由高到低排序为盐单胞菌科(62.87%)>毛螺菌科(4.67%)>肠杆菌科(3.58%)>瘤胃菌科(3.20%)>乳杆菌科(1.31%)>伯克氏菌科(1.20%)>拟杆菌门,拟杆菌目(1.09%)>根瘤菌科(0.99%)>普雷沃氏菌科(0.80%)>脱硫弧菌科(0.78%);干旱胁迫下马铃薯叶片内生细菌种群相对丰度由高到低排序为毛螺菌科(12.14%)>瘤胃菌科(8.21%)>肠杆菌科(4.41%)> Muribaculaceae (3.27%)>根瘤菌科

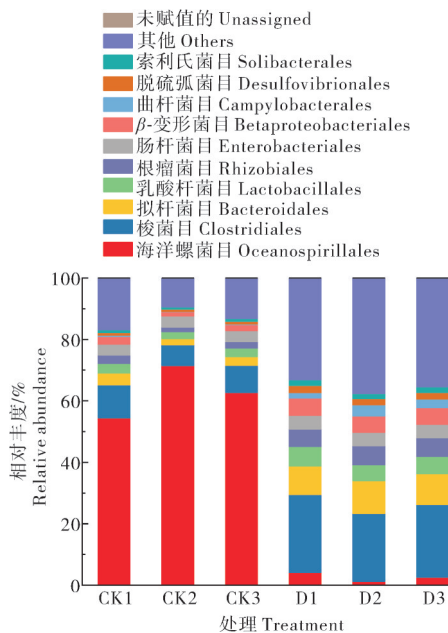


图3 干旱胁迫下马铃薯叶片内生细菌在目水平上的组成情况

Fig. 3 Composition of endophytic bacteria in potato leaves at the order level under drought stress

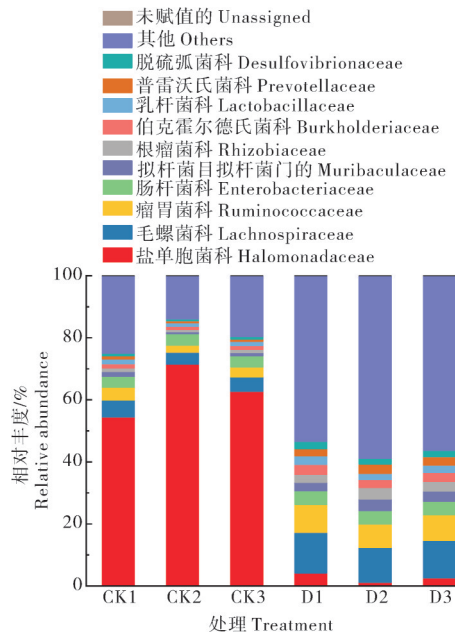


图4 干旱胁迫下马铃薯叶片内生细菌在科水平上的组成情况

Fig.4 Composition of endophytic bacteria in potato leaves at the family level under drought stress

(3.11%)>伯克氏菌科(2.87%)>普雷沃氏菌科(2.67%)>盐单胞菌科(2.66%)>乳杆菌科(2.38%)>脱硫弧菌科(2.11%)。由此看出,在科水平上,正常浇水处理下与干旱胁迫处理下马铃薯叶片内生细菌的优势菌科分别为盐单胞菌科和毛螺菌科。干旱胁迫后马铃薯叶片内生细菌相对丰度在科水平的动态变化为:盐单胞菌科降低95.88%,其余菌科相对丰度均显著增加。

在属水平上(图5),正常浇水处理下与干旱胁迫下马铃薯叶片内生细菌丰度前10的菌属主要是:candidatus_Portiera、毛螺菌属 *Lachnospira*、norank Muribaculacea、毛螺菌科 NK4A136群 *Lachnospiraceae*_NK4A136_group、根瘤菌属 *Rhizobium*、乳杆菌属 *Lactobacillus*、脱硫弧菌属 *Desulfovibrio*、杀雄菌属 *Arsenophonus*、链球菌属 *Streptococcus*、螺杆菌属 *Helicobacter*。其中,正常浇水处理下马铃薯叶片内生细菌种群相对丰度由高到低排序为 *Candidatus*_Portiera (62.85%)>毛螺菌属 (2.52%)>杀雄菌属 (2.24%)>乳杆菌属 (1.31%)>毛螺菌科 NK4A136群 (1.13%)>norank Muribaculacea (1.07%)>链球菌属 (0.83%)>脱硫弧菌属 (0.71%)>根瘤菌属 (0.67%)>螺杆菌属 (0.17%);干旱胁迫处理下马铃薯叶片内生细菌种群:毛螺菌属 (6.37%)>norank Muribaculacea (3.25%)>*Candidatus*_Portiera (2.59%)>根瘤菌属 (2.57%)>螺杆菌属 (2.56%)>乳杆菌属 (2.38%)>毛螺菌科 NK4A136群 (2.14%)>链球菌属 (1.76%)=脱硫弧菌属 (1.76%)>杀雄菌属 (0.72%)。由此看出,在属水平上,正常浇水处理下与干旱胁迫处理下马铃薯叶片内生细菌的优势菌属分别为 *candidatus*_Portiera 和毛螺菌属。干旱胁迫后马铃薯叶片内生细菌相对丰度在属水平的动态变化为:candidatus_Portiera、杀雄菌属相对丰度分别降低95.88%和68.05%,norank Muribaculacea、毛螺菌属、乳杆菌属、毛螺菌科 NK4A136群、根瘤菌属、螺杆菌属、链球菌属和脱硫弧菌属在干旱处理较正常浇水下分别提高了203.8%、152.4%、81.8%、89.7%、285.6%、1428.0%、112.0%和148.4%。

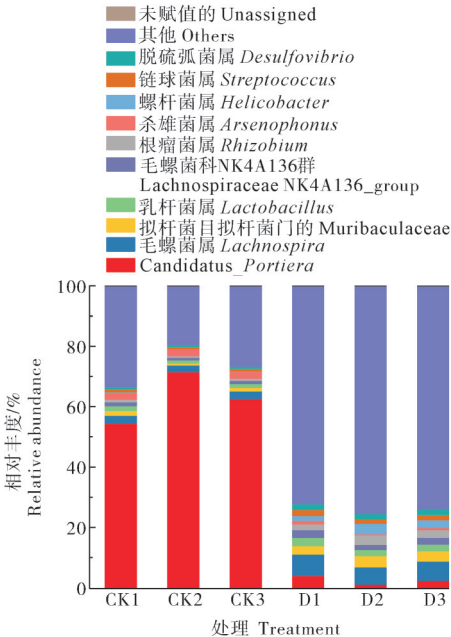


图5 干旱胁迫下马铃薯叶片内生细菌在属水平上的组成情况

Fig.5 Composition of endophytic bacteria in potato leaves at the genus level under drought stress

2.3 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性是指特定生境或者特定生态系统内的物种多样性情况,由表2可知,不同水分处理下马铃薯叶片内生细菌都有较高的丰富度和多样性,Shannon 指数正常浇水下(4.36)低于干旱处理下(9.72),说明正常浇水处理下马铃薯叶片内生细菌的丰富度低于干旱处理;Simpson 指数正常浇水下(0.6)低于干旱处理下(1.00),说明正常浇水处理下马铃薯叶片内生细菌的优势种集中度高于干旱处理;Chao1 指数正常浇水(2 136.65)低于干旱处理(2 274.90),说明马铃薯叶片内生细菌种群在干旱处理下的稀有物种多于正常浇水下的稀有物种;ACE 指数正常浇水(2 938.40)高于干旱处理(2 670.29),可以看出正常浇水处理下马铃薯叶片内生细菌种类丰富度高于干旱处理。从测序深度值看,全部样品的测序深度值都接近于1,说明测序样本中的OTU 覆盖度已经达到很高水平。

表2 干旱胁迫下马铃薯叶片内生细菌菌落多样性指数

Table 2 Diversity index of endophytic bacterial colonies of potato leaves under drought stress

分组情况 Group information	观测值 Observed species	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	Chao1 指数 Chao1 index	Ace 指数 Ace index	测序深度 Goods coverage
CK	1 548.33±227.59a	4.36±0.95b	0.60±0.11b	2 136.65±128.16a	2 938.40±310.13a	0.999 2±0.0a
D	2 006.00±337.20a	9.72±0.26a	1.00±0.00a	2 274.90±237.89a	2 670.29±292.71a	0.999 5±0.0a

2.4 稀释曲线分析

由图6可以看出,当样本序列数在 $0\sim 5\times 10^4$ 内,随着测序样本序列数增加,干旱处理的马铃薯叶片样本内发现的物种数要多于正常浇水下。随着检测序列数的增多曲线趋于平缓,表明测序数据已经基本覆盖到样本中所有的物种,增加测序数据无法再找到更多的OTUs。

2.5 基于Beta多样性的UPGMA聚类分析

由图7可知,干旱处理组(D)和正常浇水对照组(CK)各聚为一支,说明样本组间差异大,组内差异小。正常浇水处理和干旱处理下的优势菌属分别为念珠菌属 *Candidatus_Portiera*、未培养的毛螺菌科

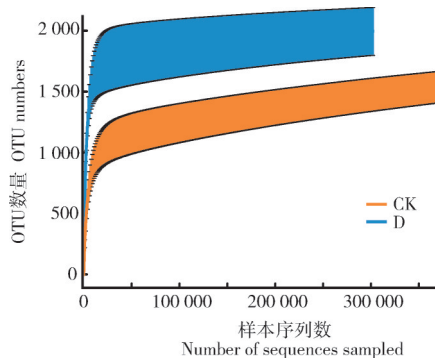


图6 样本稀释性曲线

Fig.6 Rarefaction curve sampled

uncultured_bacterium_f_ Lachnospiraceae, 分别占菌株属水平的62.85%和6.37%。

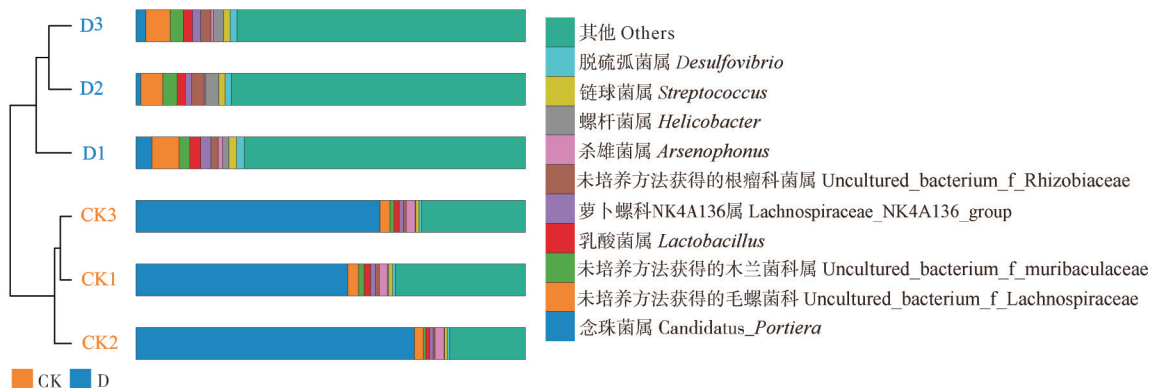


图7 UPGMA聚类分析

Fig.7 UPGMA cluster analysis

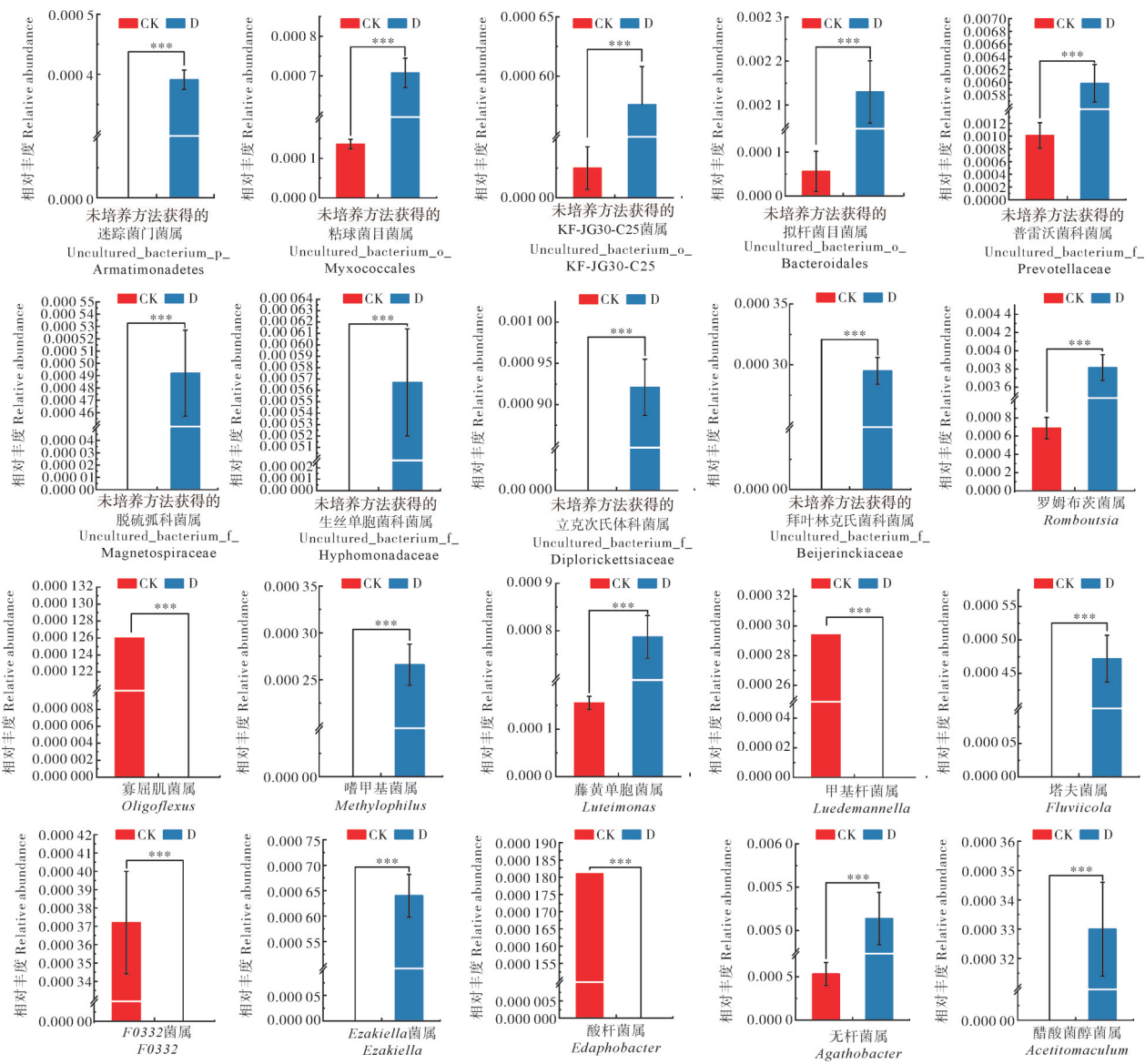
2.6 属水平组间方差分析

由图8可知,在 P 值最小的前20个物种中,马铃薯叶片细菌菌属内只有寡屈肌菌属(*Oligoflexus*)、甲基杆菌属(*Luedemannella*)、F0332菌属、酸杆菌属(*Edaphobacter*)这4种菌属的丰度在正常浇水下极显著高于干旱处理下,其余16种细菌菌属的丰度值均在干旱处理下显著高于正常浇水处理,这16种细菌菌属分别为非培养方法获得的拟杆菌目(uncultured_bacterium_o_Bacteroidales)、非培养方法获得的立克次氏体科(uncultured_bacterium_f_Diplorickettsiaceae)、嗜甲基菌属(*Methylophilus*)、醋酸菌醇菌属(*Acetitomaculum*)、非培养方法获得的KF-JG30-C25菌属(uncultured_bacterium_o_KF-JG30-C25)、非培养方法获得的生丝单胞菌科菌(uncultured_bacterium_f_Hyphomonadaceae)、塔夫菌属(*Fluviicola*)、无杆菌属(*Agathobacter*)、非培养方法获得的粘球菌目菌属(uncultured_bacterium_o_Myxococcales)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)、非培养方法获得

的脱硫弧菌(uncultured_bacterium_f_Magnetospiraceae)、非培养方法获得的迷踪菌门菌属(uncultured_bacterium_p_Armatimonadetes)、非培养方法获得的普雷沃菌科(uncultured_bacterium_f_Prevotellaceae)菌属、藤黄单胞菌属(*Luteimonas*)、非培养方法获得的拜叶林克氏菌科(uncultured_bacterium_f_Bejerinckiacae)菌属、*Ezakiella*。

3 讨论

本研究表明,干旱胁迫能影响马铃薯内生细菌群落组成结构,干旱胁迫下富集了马铃薯内生细菌优势菌门放线菌门和厚壁菌门,同时伯克霍尔氏科细菌相对丰度增加,可能是马铃薯应对干旱胁迫作出的积极响应。植物内生菌能够从植物的渗透调节物质、抗氧化系统、干旱相关基因、生理指标和激素平衡等方面来调节干旱胁迫下植物组织活性氧(ROS)毒害和渗透平衡,从而缓解干旱胁迫对植物的伤害,使植物在缺水环境下也能生长^[23]。许多研究发现多种植物不同组织内生细菌具有丰富的多



柱子上*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$ 。* on the column represents $P<0.05$, ** represent $P<0.01$, *** represent $P<0.001$.

图8 干旱胁迫下马铃薯叶片细菌在属水平组间方差分析

Fig.8 Variance analysis of leaf bacteria at genus level in potato under drought stress

样性,且功能各异。例如巨菌草(*Pennisetum* sp.)植株具有产 IAA、溶磷、固氮能力和产铁载体能力的内生细菌^[24],水稻叶片内有分泌植物生长激素、调节水稻的生命活动,能影响水稻乳熟期光合产物的分布的成团泛菌(*Pantoea agglomerans*) YS19^[25],马铃薯根中含有能拮抗马铃薯结痂(PCS)的内生细菌^[26]。本研究发现,正常浇水和干旱胁迫下,丽薯 6 号马铃薯叶片中的优势内生细菌菌门均是变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria),与杨金睿等^[27]研究结果一致,表明干旱胁迫不会影响马铃薯

叶片内生细菌优势菌门的组成,只会改变其丰度。Su 等^[28]研究发现,干旱胁迫会显著增加放线菌的丰度,说明其在干旱胁迫下具有更强的耐受性,我们前期在丽薯 6 号马铃薯叶片中分离得到 1 株厚壁菌门的菌株苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*),发现其可以通过产生生长素(IAA)和 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶(ACC)来促进马铃薯生长发育,缓解干旱胁迫对马铃薯造成的不利影响^[29]。在本研究中,干旱胁迫下放线菌门和厚壁菌门相对丰度较对照增加了 113.55% 和 158.25%,与前人研究结果吻合,放线菌可以上调渗透调节和抗氧化防御代谢,改善植物的

生长和光合作用,从而提高植株的抗旱能力^[30],表明干旱胁迫会使马铃薯内生放线菌富集,从而来改善干旱胁迫对植株的伤害。然而,本研究还发现,干旱胁迫下变形菌门菌株相对丰度降低56.0%,拟杆菌门菌株相对丰度增加了240.77%,目前还未曾有研究表明,这些菌门相对丰度的增加或减少是否会影响植株对干旱胁迫的响应,其他差异显著的细菌也有待于进一步研究。在本研究中,Shannon指数正常浇水下(4.36)低于干旱处理下的(9.72),说明正常浇水处理下马铃薯叶片内生细菌的丰富度低于干旱处理;Simpson指数正常浇水下(0.60)低于干旱处理下的(1.00),说明干旱处理下马铃薯叶片内生细菌的优势种集中度高于正常浇水处理。

伯克霍尔德氏菌 *PsJN* (*Burkholderia ptofi*) *PsJN*是从洋葱根部分离出的一种内生细菌,在提高宿主植物对生物和非生物胁迫的耐受性中发挥着重要作用。Yang等^[31]发现伯克霍尔德氏菌 *PsJN*可以在盐胁迫下刺激藜麦的生长和提高产量。将伯克霍尔德氏菌接种于干旱胁迫下的马铃薯植株中时,其细胞内部环境稳定、转录调控和活性氧伤害中所用的转录物得到了改善^[32]。本研究中也检测到了与伯克霍尔德氏菌 *PsJN*同科的内生细菌伯克霍尔德氏科(*Burkholderiaceae*),且该菌科的相对丰度在干旱胁迫下增加了139.09%,由此可以推测,马铃薯内生伯克霍尔德氏科菌是马铃薯形成干旱防御机制的重要因素,该菌可能在马铃薯植株应对干旱胁迫中发挥着重要作用,是未来利用内生菌缓解马铃薯干旱胁迫的重要材料。

参考文献 References

- [1] 李青,秦玉芝,王万兴,等.马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)干旱胁迫生理特性及耐旱性分析[J].分子植物育种,2021,19(1):259-268.LI Q, QIN Y Z, WANG W X, et al. Analysis of physiological characteristics and drought tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) under drought stress [J]. Molecular plant breeding, 2021, 19(1): 259-268 (in Chinese with English abstract).
- [2] 谢从华,柳俊.中国马铃薯科技发展与创新之回顾[J].华中农业大学学报,2021,40(4):16-26.X C, LIU J. Development and innovation of science and technology of potato in China [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40(4): 16-26 (in Chinese with English abstract).
- [3] MONNEVEUX P, RAMIREZ D A, PINO M T. Drought tolerance in potato (*S. tuberosum* L.): can we learn from drought tolerance research in cereals? [J]. Plant science, 2013, 205/206(1): 76-86.
- [4] MAHAJAN S, TUTEJA N. Cold, salinity and drought stresses: an overview [J]. Archives of biochemistry and biophysics, 2005, 444: 139-158.
- [5] SCHAFLEITNER R, ROSALES R O G, GAUDIN A, et al. Capturing candidate drought tolerance traits in two native Andean potato clones by transcription profiling of field grown plants under water stress [J/OL]. Plant physiol biochem, 2007, 45(9): 673-690.
- [6] ADMASSIEA M, WOLDEHAWARIATB Y, ALEMU T, et al. The role of plant growth-promoting bacteria in alleviating drought stress on pepper plants [J/OL]. Agricultural water management, 2022, 272(1): 107831 [2022-09-23]. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2022.107831>.
- [7] SOOD G, KAUSHAL R, SHARMA M. Alleviation of drought stress in maize (*Zea mays* L.) by using endogenous endophyte *Bacillus subtilis* in North West Himalayas [J]. Soil & plant science, 2020, 70(5): 361-370.
- [8] LAROUSSE M, RANCUREL C, SYSKA C, et al. Tomato root microbiota and *Phytophthora parasitica*-associated disease [J/OL]. Microbiome, 2017, 5: 56 [2022-09-23]. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0273-7>.
- [9] BECKERS B, BEEK M O D, WEYENS N, et al. Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees [J/OL]. Microbiome, 2017, 5: 25 [2022-09-23]. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0241-2>.
- [10] HASSAN S E D. Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. [J]. Journal of advanced research, 2017, 8(6): 687-695.
- [11] SINGH M, KUMAR A, SINGH R, et al. Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds [J/OL]. Biotech, 2017, 7(5): 315 [2022-09-23]. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0942-z>.
- [12] XIE Z C, CHU Y K, ZHANG W J, et al. *Bacillus pumilus* alleviates drought stress and increases metabolite accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. Environmental and experimental botany, 2019, 158: 99-106.
- [13] GAGNE-BOURGUE F, ALIFERIS K A, SEGUIN P, et al. Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars [J]. Journal of applied microbiology, 2013, 114(3): 836-853.
- [14] ZLATEV Z, LIDON F C. An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis [J]. Emirates journal of food & agriculture, 2012, 24(1): 57-72.
- [15] ABID M, ALI S, QI L K, et al. Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and

- jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Rep, 2018, 8 (1) : 4615 [2022-09-23]. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21441-7>.
- [16] LULSDORF M M, YUAN H Y, SLATRE S M H, et al. Endogenous hormone profiles during early seed development of *C. arietinum* and *C. anatolicum* [J]. Plant growth regulation, 2013, 71(2):191-198.
- [17] 韩德鹏,尹智宇,杨蓓,等.干旱胁迫对冬播马铃薯现蕾期生理生化指标的影响[J].中国马铃薯,2020,34(2):78-85. HAN D P, YIN Z Y, YANG B, et al. Effects of drought stress on physiological and biochemical indexes of winter sowing potato at bud flower stage [J]. Chinese potato journal, 2020, 34 (2):78-85(in Chinese with English abstract).
- [18] 任家慧,杨森,王玥,等.基于云南主栽马铃薯品种抗氧化防御系统对干旱胁迫的响应研究[J].西南农业学报,2020,33(6):1158-1164. REN J H, YANG M, WANG Y, et al. Response of potato antioxidant defense system to drought stress based on main planting varieties in Yunnan [J]. Southwest China journal of agricultural sciences, 2020, 33(6):1158-1164(in Chinese with English abstract).
- [19] 颜朗,张义正,清源,等.马铃薯全生育期内根际微生物组变化规律[J].微生物学报,2020,60(2):246-260. YAN L, ZHANG Y Z, QING Y, et al. Community rhythms of rhizosphere microbiome during the whole life cycle of potato [J]. Acta microbiologica sinica, 2020, 60 (2) : 246-260 (in Chinese with English abstract).
- [20] 黄文莉,马杰,江敏,等.干旱胁迫对马铃薯抗旱生理影响及相关基因的表达[J].分子植物育种,2021,19(21):7213-7221. HUANG W L, MA J, JIANG M, et al. Drought resistance physiology and related gene expression of potato upon drought stresses [J]. Molecular plant breeding, 2021, 19 (21) : 7213-7221(in Chinese with English abstract).
- [21] 张海龙.产黄酮银杏内生菌的分离、鉴定与发酵条件优化研究[D].南京:南京农业大学,2014. ZHANG H L. Study on isolation, Identification and fermentative optimization of flavonoids-producing endobhyites from *Ginkgo biloba* L. [D]. Nanjing : Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [22] OREN A, GARRITY G M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes [J/OL]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2021, 71(10):005056 [2022-09-23]. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>.
- [23] 曹凯,李远婷,安登第,等.内生菌对植物抗干旱胁迫能力的影响研究进展[J].生物技术通报,2015,31(9):23-29. CAO K, LI Y T, AN D D, et al. Research progress on effects of endophytes on plant drought resistance [J]. Biotechnology bulletin, 2015, 31(9):23-29(in Chinese with English abstract).
- [24] 邓振山,李买平,郝雷,等.巨菌草内生细菌多样性及其促生特性[J].草地学报,2019,27(5):1213-1220. DENG Z S, LI M P, HAO L, et al. Diversity and plant growth promoting activities of the culturable endophytic bacteria associated with *Pennisetum* sp. [J]. Acta agrestia sinica, 2019, 27 (5) : 1213-1220(in Chinese with English abstract).
- [25] 沈德龙,冯永君,宋未.内生菌泛菌YS19对水稻乳熟期光合产物在旗叶、穗分配中的影响[J].自然科学进展,2002,12(8):863-865. SHEN D L, FENG Y J, SONG W. Influence of the endogamous pan-organism YS19 on the distribution of photosynthetic products in the flag leaf and spike of rice during lactation [J]. Advances in natural sciences, 2002, 12 (8) : 863-865(in Chinese with English abstract).
- [26] SU G, LI M, WANG B, et al. Distribution of bacterial endophytes in the non-lesion tissues of potato and their response to potato common scab [J/OL]. Frontiers in microbiology, 2021, 12 (9) : 616013 [2022-09-23]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.616013>.
- [27] 杨金睿,王文倩,吉泽,等.云南省4个主栽马铃薯品种叶片内生细菌多样性研究[J].华北农学报,2021,36(6):178-188. YANG J R, WANG W Q, JI Z, et al. Study on the diversity of endophytic bacteria in leaves of four potato varieties in Yunnan province [J]. Acta agriculturae boreali-sinica, 2021, 36 (6) : 178-188(in Chinese with English abstract).
- [28] SU X, ZHOU G, DU Z, et al. Drought accelerated recalcitrant carbon loss by changing soil aggregation and microbial communities in a subtropical forest [J/OL]. Soil Biol Biochem, 2020, 148: 107898 [2022-09-23]. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107898>.
- [29] 吉泽,李俊逸,姚遥,等.1株马铃薯内生Bt菌株的鉴定及其对干旱胁迫的缓解作用[J].南方农业学报,2022,53(12):3389-3399. JI Z, LI J Y, YAO Y, et al. Identification of an endophytic Bt strain from potato and its alleviation to drought stress [J]. Journal of southern agriculture, 2022, 53 (12) : 3389-3399(in Chinese with English abstract).
- [30] SELIM S, HASSAN Y M, SALEH A M, et al. Actinobacterium isolated from a semi-arid environment improves the drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) [J]. Plant physiol biochem, 2019, 142:15-21.
- [31] YANG A, AKHTAR S S, FU Q, et al. *Burkholderia phytofirmans* PsJN stimulate growth and yield of quinoa under salinity stress [J/OL]. Plants, 2020, 9(6):672 [2022-09-23]. <https://doi.org/10.3390/plants9060672>.
- [32] RAHELEH S T, RTHOMAS R, ANGELA S, et al. Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress [J]. mBio, 2015, 6(5):615-621.

Effect of drought stress on composition and structure of endosymbiotic bacteria in potato leaves

JI Ze¹, XIAO Guanli¹, CHEN Bin², LI Junyi¹, YAO Yao¹, ZHU Chunyue¹, YANG Jinrui¹

1.College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2.College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China.

Abstract High-throughput sequencing of 16S rRNA from endosymbiotic bacteria in potato leaves under drought stress was performed with Illumina Novaseq sequencing technology to understand the changes in the composition and structure of endosymbiotic bacteria in potatoes under drought stress. The effects of drought stress on the composition, structure, and diversity of endosymbiotic bacteria in potato leaves were studied. The results showed that 1 548 and 2 006 taxonomic sequences were obtained from potato leaves under normal watering and drought stress, respectively. Among them, 287 were unique OTUs under normal watering and 769 were unique OTUs under drought stress. Under drought stress, the abundance of the endosymbiotic bacteria candidatus *Portiera* and *Arsenophonus* decreased by 95.9% and 68.1% compared with that under normal watering, while the abundance of Muribaculaceae, *Lachnospira*, *Lactobacillus*, Lachnospiraceae_NK4A136_group, *Rhizobium*, *Helicobacter*, *Streptococcus* and *Desulfovibrio* increased by 203.8%, 152.4%, 81.8%, 89.7%, 285.6%, 1 428.0%, 112.0% and 148.4% respectively under drought stress compared with that under normal watering. The Shannon index and Simpson index under drought stress were significantly higher than that under normal watering, while the ACE index and Chao1 index under drought stress were not significantly different from that under normal watering. It is indicated that drought stress can affect the composition of endosymbiotic bacterial communities in potatoes. Under drought stress, the endosymbiotic dominant bacteria Actinomycetota and Bacillota were enriched, and the relative abundance of Burkholderiaceae bacteria increased, which may be the positive response of potato to drought stress.

Keywords potato; endosymbiotic bacteria; drought stress; microbial community; high throughput sequencing

(责任编辑:张志钰)