

研究报告



草假单胞菌 HT1 在蚕豆根和茎的定殖特性及对内生细菌多样性的影响

张慧 马连杰 卢文才 余端 杭晓宁 廖敦秀*

重庆市农业科学院农业资源与环境研究所 重庆 401329

摘要:【背景】关于蚕豆内生防细菌的定殖规律及其对内生细菌微生物多样性的研究鲜有报道。【目的】明确草假单胞菌 HT1 在蚕豆的定殖特性以及对根茎部内生细菌群落多样性的影响。【方法】采用抗生素标记法测定菌株 HT1 的定殖特性,利用高通量测序技术分析该菌灌根处理与对照处理蚕豆根茎部内生细菌的群落多样性。【结果】菌株 HT1 的定殖数量为根>茎>叶,呈先升后降的趋势,根部、茎部、叶部在第 7 天达到最大值,在第 83 天仍能检测到标记菌株。灌根处理降低了内生细菌的丰富度,提高了根内生细菌物种多样性;灌根处理组根部厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门丰度显著提高,茎部变形菌门的相对丰度有所升高但无显著影响;在属水平上,灌根处理后,根部如 *Romboutsia*、*Mitsuaria*、乳杆菌属、德沃斯氏菌属等属的相对丰度明显升高,茎部假单胞菌、*Muribaculaceae*、*Elstera*、鞘氨醇单胞菌属等属的相对丰度明显升高。【结论】HT1 菌株能在蚕豆植株体内定殖达 83 d 以上,并且可以影响蚕豆植株内部的微生物群落结构组成,提高相关微生物的相对丰度。

关键词: 草假单胞菌 HT1, 蚕豆, 定殖, 微生物群落结构

Colonization characteristics of *Pseudomonas poae* HT1 in roots and stems of faba bean and its effect on endophytic bacterial diversity

ZHANG Hui MA Lianjie LU Wencai YU Duan HANG Xiaoning LIAO Dunxiu*

Institute of Agricultural Resources and Environment, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China

Abstract: [Background] There are few reports on the colonization of endophytic control bacteria in faba bean and the diversity of endophytic bacteria. [Objective] To investigate the colonization characteristics of *Pseudomonas poae* HT1 in faba bean and its effect on the diversity of endophytic bacterial community in the rhizome. [Methods] The colonization characteristics of strain HT1 were determined by antibiotic labeling method, and the community diversity of endophytic bacteria in root and stem of strain HT1 was

Foundation items: Chongqing Municipal Performance Incentive and Guidance Special (cqas2019jx110, cqas2020jxj108); Chongqing Agricultural Development Fund (NKY-2021AC002); Chongqing Fine Seed Innovation Project (NKY-2021AB003)

*Corresponding author: E-mail: xiuchai2006@163.com

Received: 25-03-2021; Accepted: 20-05-2021; Published online: 19-07-2021

基金项目: 重庆市绩效激励引导专项(cqas2019jx110, cqas2020jxj108); 重庆市农发基金项目(NKY-2021AC002); 重庆市良种创新项目(NKY-2021AB003)

*通信作者: E-mail: xiuchai2006@163.com

收稿日期: 2021-03-25; 接受日期: 2021-05-20; 网络首发日期: 2021-07-19

analyzed by high-throughput sequencing technology. [Results] The number of colonization of strain HT1 was root>stem>leaf, which increased first and then decreased. The root, stem and leaf reached the maximum on the 7th day, and the labeled strain could still be detected on the 83rd day. Root irrigation reduced the richness of endophytic bacteria and increased species diversity of endophytic bacteria in roots. The abundances of *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* in roots were significantly increased in irrigated root group, while the relative abundances of *Proteobacteria* in stems were increased but had no significant effect. At the genus level, after root irrigation, the relative abundance of *Romboutsia*, *Mitsuaria*, *Lactobacillus*, *Devosia* and other genera increased significantly in the root, and the relative abundance of *Pseudomonas*, *Muribaculaceae*, *Elstera*, *Sphingomonas* in the stem increased significantly. [Conclusion] The strain HT1 could colonize in faba bean plants for more than 83 days, and could affect the composition of microbial community inside the plants and improve the relative abundance of related microorganisms.

Keywords: *Pseudomonas poae* HT1, faba bean, colonization, microbial community structure

蚕豆(Faba Bean)俗称佛豆、胡豆、寒豆、南汉豆、利马豆、川豆等,属越年生或一年生豆科野豌豆属草本植物^[1]。蚕豆起源于非洲北部和亚洲西南部^[2],而我国是蚕豆种植和生产大国,蚕豆在全国大多数省份都可种植,由于蚕豆有良好的营养价值,富含蛋白质、膳食纤维、微量元素等营养物质^[3],其生产得到大力发展,面积正逐年扩大。在生产中,蚕豆的生长受到各种病害的胁迫,对蚕豆的产量和品质构成了显著的约束^[4-10],其中赤斑病是世界蚕豆产区的主要病害^[7]。蚕豆赤斑病(Chocolate Spot of Broad Bean)主要由蚕豆葡萄孢(*Botrytis fabae*)和灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)引起^[11-12]。目前防治该病害的主要措施有选育抗性品种、化学药剂防治等,但抗性品种稳定性较差,化学防治会导致病原物产生抗药性且农药的高残留还可造成环境污染等种种弊端^[13]。因此,采用绿色环保、不易产生抗药性、费用低廉的拮抗微生物防治病害成为了近年的研究热点。

假单胞菌因其适应能力强、产生多种抗菌素^[14]、有效的根际定殖和诱导植物抗性^[15]、促生作用^[16]等优势成为生防菌株的研究热点。大量研究表明,生防细菌在植物体内的定殖能力与其生防效果呈正相关^[17-18],接种生防细菌在宿主体内稳定保持一定菌体数量是保证防治效果的关键因素之一^[19-20]。目前关于蚕豆内生防细菌的定殖规律及对内生细菌多样性影响的研究鲜有报道。因此,本研究以内生草假单胞菌 HT1 为研究对象,

通过氨苄青霉素标记法获得标记菌株 HT1-A,利用灌根法研究该菌在蚕豆体内的定殖规律,采用高通量测序技术分析其对蚕豆内生细菌多样性和群落结构的影响,以期研究该菌生防作用机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株:草假单胞菌(*Pseudomonas poae*) HT1 分离自重庆市永川区蚕豆叶片中,病原菌为蚕豆葡萄孢,均由本研究室保存。

LB 液体培养基:胰蛋白胨 10.0 g,酵母浸粉 5.0 g,氯化钠 10.0 g,加蒸馏水至 1 000 mL, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。LB 固体培养基:LB 液体培养基中加入琼脂粉 18.0-20.0 g/L。

土壤:试验土壤类型为紫色土,土壤采集地点位于重庆市九龙坡区白市驿镇重庆市农业科学院(E106°21'45", N29°27'23"),去除石块和植物残枝烂叶后过 1 mm 筛,于烘箱中 120 °C 处理 4 h,冷却后备用。

1.2 抗生素标记菌株的筛选及稳定性测定

采用氨苄青霉素标记法^[21-22]标记菌株 HT1,获得氨苄青霉素抗性菌株 HT1-A。在氨苄青霉素抗性诱导结束后,采用划线法将抗性菌株 HT1-A 转接至不含氨苄青霉素的 LB 平板上连续转接 5 代后,再回接至含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上检测其遗传稳定性;挑取原始菌株 HT1 和标记

菌株于 30 °C、180 r/min 振荡培养, 分别于 3、6、12、24、48 h 测定 OD_{600} 值, 绘制生长曲线; 选择与原始菌株相似并具有稳定性状的抗生素标记菌株, 将其命名为 HT1-A。采用平板对峙法^[23]测定原始菌株 HT1 与标记菌株 HT1-A 对蚕豆葡萄孢的拮抗效果。

1.3 标记菌株在蚕豆植株内的定殖动态

将菌株 HT1-A 接种于含 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 48 h, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清, 将菌沉淀用无菌水洗 2 次, 调节 OD_{600} 为 1.0。采用灌根法^[24]处理, 用注射器将发酵液均匀浇灌植株根围, 每隔 5 d 浇一次, 每次 20 mL, 共计灌根 2 次, 空白对照(CK)采用 20 mL 无菌水。

1.4 菌株 HT1-A 在植株体内的定殖测定

参照汪腾等^[25]方法进行菌株分离, 于接种后第 3、7、14、21、28、35 和 83 天取灌根组及对照组根茎叶进行目标菌株的分离。分别称取蚕豆根茎叶样品各 0.5 g, 用 75%乙醇消毒 30 s, 无菌水清洗 3 次, 取最后一次冲洗的无菌水 100 μL 涂布于含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上, 无细菌生长则证明消毒彻底。在无菌研钵中加入 1 mL 无菌水, 将样品置于研钵中研磨匀浆, 静置 10 min 后再用无菌水进行梯度稀释, 稀释为 10^{-1} – 10^{-6} 。取 100 μL 各梯度稀释液分别涂布于含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素 LB 培养基平板上, 于 30 °C 黑暗培养 3 d 后, 结合菌落形态进行平板计数, 计算出每克鲜组织含菌量(CFU/g)^[26-27], 每处理 3 次重复。

1.5 蚕豆植株基因组 DNA 提取和高通量测序

分别称取蚕豆根和茎样品 1 g, 自来水流水冲洗 20 min, 无菌纸吸干水分, 再分别用 75%无水乙醇消毒 2 min, 并用 2.5%次氯酸钠溶液消毒 5 min, 然后无菌水漂洗 3 次^[28-29]。植株 DNA 经 DNA Isolate Kit 提取并纯化后, 针对细菌 16S rRNA 基因的 V3–V4 区段进行 PCR 扩增及测序分析, 细菌 16S rRNA 基因扩增引物为 338F (5'-ACT

CCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806R (5'-GGACT ACHVGGGTWTCTAA-3')。PCR 反应体系(25 μL): 5 \times Reaction Buffer 5.0 μL , 5 \times GC Buffer 5.0 μL , Taq 酶(5 U/ μL) 0.25 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL , 正、反向引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 1 μL , DNA 模板 2.0 μL , ddH₂O 8.75 μL 。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 25 个循环; 72 °C 5 min^[30]。PCR 产物送到上海派森诺生物科技股份有限公司进行 Illumina MiSeq 高通量测序。

1.6 数据处理与分析

首先对蚕豆植株基因组 DNA 样品进行平行测序, 参考文献[31]方法对双端序列进行去引物、拼接、质量过滤、去重、去嵌合体、聚类步骤, 从而获得每个样本的有效序列, 得到优化序列后对其进行数据统计。运用 QIIME 软件, 调用 UCLUST 这一序列比对工具, 对取得的序列按相似度为 97%的序列进行归并和 OTU 划分^[32], 并选取每个 OTU 中丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列进行生物信息统计分析。对 OTU 丰度矩阵中的全体样本按最低测序深度水平进行随机重抽样, 用 QIIME 软件获得每个样本的 Chao1 指数^[33]、Simpson 指数^[34]和 Shannon 指数^[35]。使用 QIIME 软件获取各样本在门水平上的组成和丰度分布表, 比较微生物的分布情况。数据和图表采用 SPSS 22.0 进行独立样本 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 抗生素标记菌株的筛选及稳定性分析

通过对菌株 HT1 进行抗生素筛选, 获得了对氨苄青霉素具有抗性的突变菌株, 标记为 HT1-A。将菌株 HT1-A 在 LB 培养基中连续培养 10 代后, 转接到含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基中可以正常生长, 菌落形态及颜色与原始菌株基本相同, 表明诱变菌株的抗性标记是稳定的。抑菌试验结果表明, 与蚕豆葡萄孢对峙培养 7 d 后, 原始菌株 HT1 和标记菌株 HT1-A 对蚕豆葡萄孢的抑

菌半径为 11.34 mm 和 11.21 mm。同时, 菌株 HT1 和菌株 HT1-A 的生长速率基本一致, 在培养 24 h 时 OD_{600} 值达到最大, 分别为 2.259 和 2.241 (图 1), 说明菌株 HT1-A 的抗性标记是稳定的, 而且抑菌能力和生长速率基本相同, 可用于蚕豆植株中的定殖测定。

2.2 菌株 HT1-A 在蚕豆植株体内的定殖

如图 2 所示, 采用灌根方法接种均可在蚕豆植株根、茎、叶部位分离到菌株 HT1-A, 而对照组在 LB 平板(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素)上未长出菌落; 灌根处理组, 蚕豆根、茎、叶中所分离菌株的菌落形态、颜色均与原始菌株相似; 灌根处理后,

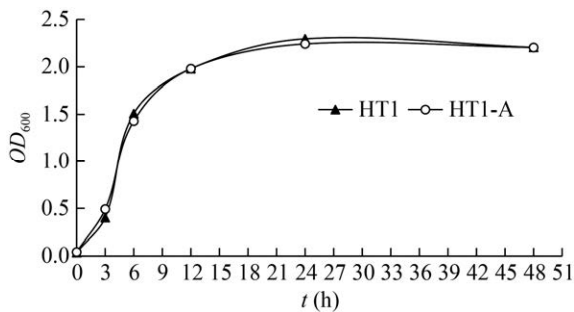


图 1 菌株 HT1-A 与原始菌株 HT1 的生长曲线
Figure 1 Growth curve of strain HT1-A and original strain HT1

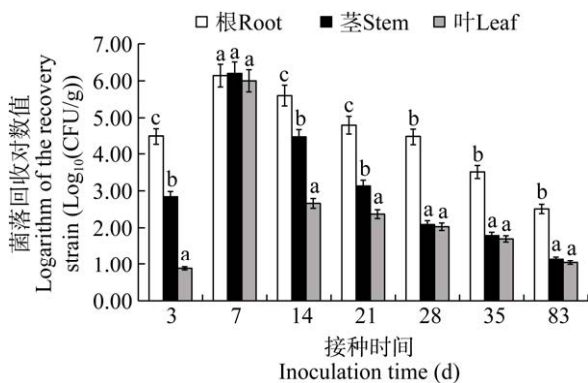


图 2 灌根法测定菌株 HT1-A 在蚕豆植株体内的定殖情况

Figure 2 Determining the colonization of strain HT1-A in faba bean plants by root irrigation method

注: 不同小写字母表示不同处理间的差异显著($P < 0.05$)

Note: The different lowercase letters represent different treatment's significant difference at 0.05 level

标记菌株 HT1-A 在蚕豆根、茎、叶中均能定殖且定殖数量为根>茎>叶, 定殖量均呈现先升后降的趋势, 而且在根、茎、叶中的定殖量在第 7 天时达到最大值, 分别为 1.39×10^6 、 1.59×10^6 和 1.01×10^6 CFU/g; 第 14 天后定殖量逐渐下降, 在第 83 天仍可检测到一定数量的标记菌株, 根、茎、叶中定殖量分别为 2.26×10^3 、 1.10×10^1 和 1.40×10^1 CFU/g, 表明该菌株可以在蚕豆植株体内定殖一定时期, 定殖时间在 83 d 以上。

2.3 植株内生微生物多样性及群落结构

2.3.1 植株测序结果分析

利用高通量测序技术测序并优化从根茎样品中提取的 DNA 后, 从蚕豆根部样品中获得 436 193 条细菌有效序列, 平均每个样本 72 698 条; 从茎部样品中获得 421 211 条有效序列, 每个样本 70 201 条。12 份样本在 97% 相似水平下聚类分析共得到 801 个细菌 OTU, 所有样品的序列稀释曲线逐渐趋于平缓(图 3), 说明该测序深度合理, 能够比较完整地反映出植株中细菌群落的结构和种类。

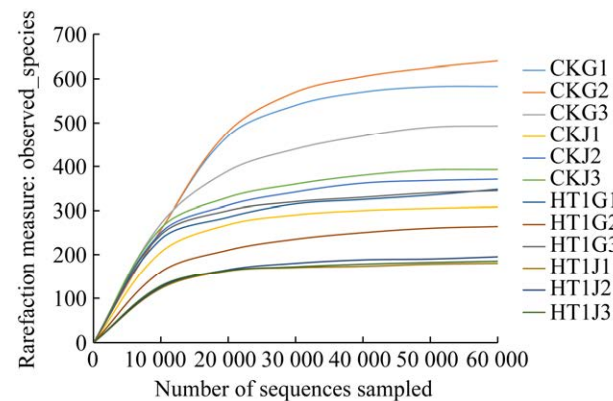


图 3 在 97% 相似水平下所有处理所观察到物种数的稀释曲线

Figure 3 Dilution curves of species numbers observed for all treatments at 97% similar levels

注: CK: 对照; HT1: *P. poae* HT1; G: 根部; J: 茎部; 相同字母后不同数字编号表示 3 个重复

Note: CK: Control; HT1: *P. poae* HT1; G: Root; J: Stem; The different numbers after the same letter represent 3 repetitions

2.3.2 根茎微生物的 OTU 及多样性分析

对不同处理 OTU 进行分析, 与对照根部的 192 个 OTU 数相比, HT1 菌株灌根处理组的根部细菌物种数增加了 78 个, 而与对照茎部的 236 个 OTU 数相比, HT1 菌株灌根处理组的根部细菌物种数减少了 133 个。在 97% 分类水平下, 对蚕豆根茎的内生微生物群落多样性与相对丰度进行多样性分析, 如表 1 所示, Chao1 指数分析结果显示, HT1 菌株灌根处理蚕豆根茎内生细菌的丰富度显著性降低; Shannon 指数和 Simpson 指数分析结果显示, HT1 菌株灌根处理蚕豆根内生细菌的物种多样性显著增加, 而茎内生细菌的物种多样性显著降低。

2.3.3 蚕豆植物内微生物群落结构特征

将蚕豆 6 份根部样品经聚类分析所获得的 1 208 个细菌 OTU 归属到 10 个门(图 4A): 变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、*Patescibacteria*、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、*Spirochaetes*、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)和 *Tenericutes*, 其中变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)为优势细菌类群, 约占所有细菌的 99% 以上。

表 1 不同处理对蚕豆根茎微生物 α 多样性指数的影响
Table 1 Effects of different treatments on the microbial alpha diversity index of faba bean rhizomes

Item		CK	HT1
根	OTUs	192	270
Root	Chao1 index	238.758 70a	187.171 70a
	Shannon index	3.374 40a	6.336 20b
	Simpson index	0.767 96a	0.978 00b
茎	OTUs	236	103
Stem	Chao1 index	189.241 70b	56.796 10a
	Shannon index	5.632 70b	4.708 90a
	Simpson index	0.951 94b	0.930 10a

注: CK: 对照; HT1: *P. poae* HT1。不同小写字母表示不同处理间的差异显著($P < 0.05$)

Note: CK: Control; HT1: *P. poae* HT1. The different lowercase letters represent different treatment's significant difference at 0.05 level

将蚕豆 6 份茎样品经聚类分析所获得的 656 个细菌 OTU 归属到 10 个门(图 4B), 包括变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)、*Spirochaetes* 和硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*), 其中优势细菌类群变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)约占所有细菌的 99%。

如图 5A 所示, 在灌根处理组的蚕豆根部细菌中, 厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门、绿弯菌门、*Patescibacteria*、疣微菌门、*Spirochaetes*、芽单胞菌门、*Tenericutes* 的相对丰度有所升高, 其中, 厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门丰度显著提高($P < 0.05$), 而变形菌门相对丰度显著降低($P < 0.05$)。此外, 灌根处理组的蚕豆茎部细菌中, 变形菌门的相对丰度有所升高; 而厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、芽单胞菌门、梭杆菌门、*Spirochaetes*、硝化螺旋菌门的相对丰度有所降低, 其中拟杆菌门下降最显著(图 5B) ($P < 0.05$)。

如图 6 所示, 属水平上的物种组成热图分析显示, 灌根处理后, 蚕豆根部细菌如 *Romboutsia*、*Mitsuaria*、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、德沃斯氏菌属(*Devosia*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、*Paucibacter*、微枝形杆菌属(*Microvirga*)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas*)、贪铜菌属(*Cupriavidus*)、鞘氨醇单胞菌属(*sphingomonas*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、*Massilia* 和甲基杆菌属(*Methylobacterium*)等属的相对丰度明显升高, 而肠杆菌属(*Enterobacter*)则相反; 蚕豆茎部细菌如假单胞菌(*Pseudomonas*)、*Muribaculaceae*、*Elstera*、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* 等属的相对丰度明显升高, 而不动杆菌属(*Acinetobacter*)、*Romboutsia*、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* 和严格梭菌属(*Clostridium_sensu_stricto_1*)等相对丰度明显下降。

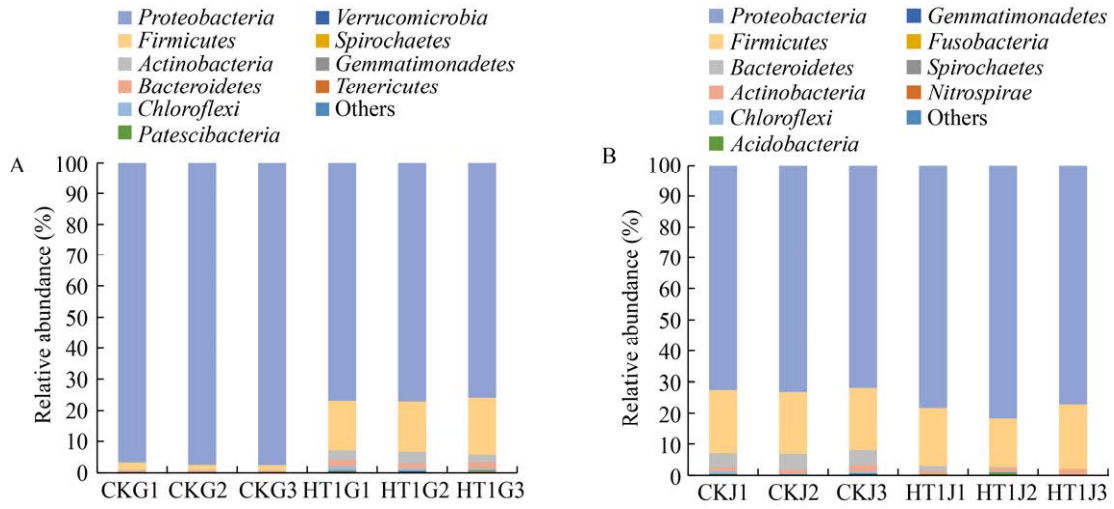


图 4 不同处理对蚕豆植株内微生物群落结构的影响

Figure 4 Effects of different treatments on microbial community structure in faba bean plants

注: A: 根部; B: 茎部。CK: 对照; HT1: *P. poae* HT1。相同字母后不同数字编号表示 3 个重复

Note: A: Root; B: Stem. CK: Control; HT1: *P. poae* HT1. The different numbers after the same letter represent 3 repetitions

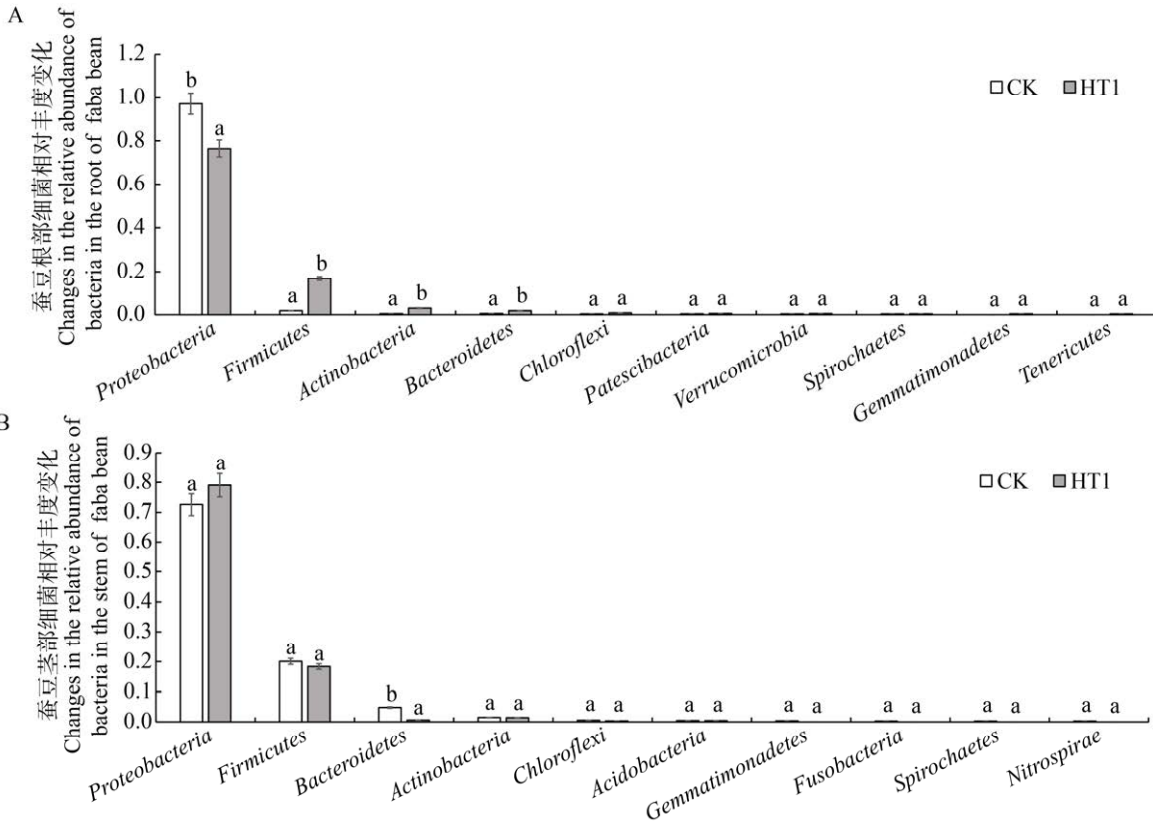


图 5 不同处理对门水平下蚕豆植株内微生物的影响

Figure 5 Effects of different treatments on microorganism in faba bean plants at phylum level

注: A: 根部; B: 茎部。CK: 对照; HT1: *P. poae* HT1; 不同小写字母表示不同处理间的差异显著($P < 0.05$)

Note: A: Root; B: Stem. CK: Control; HT1: *P. poae* HT1; The different lowercase letters represent different treatment's significant difference at 0.05 level

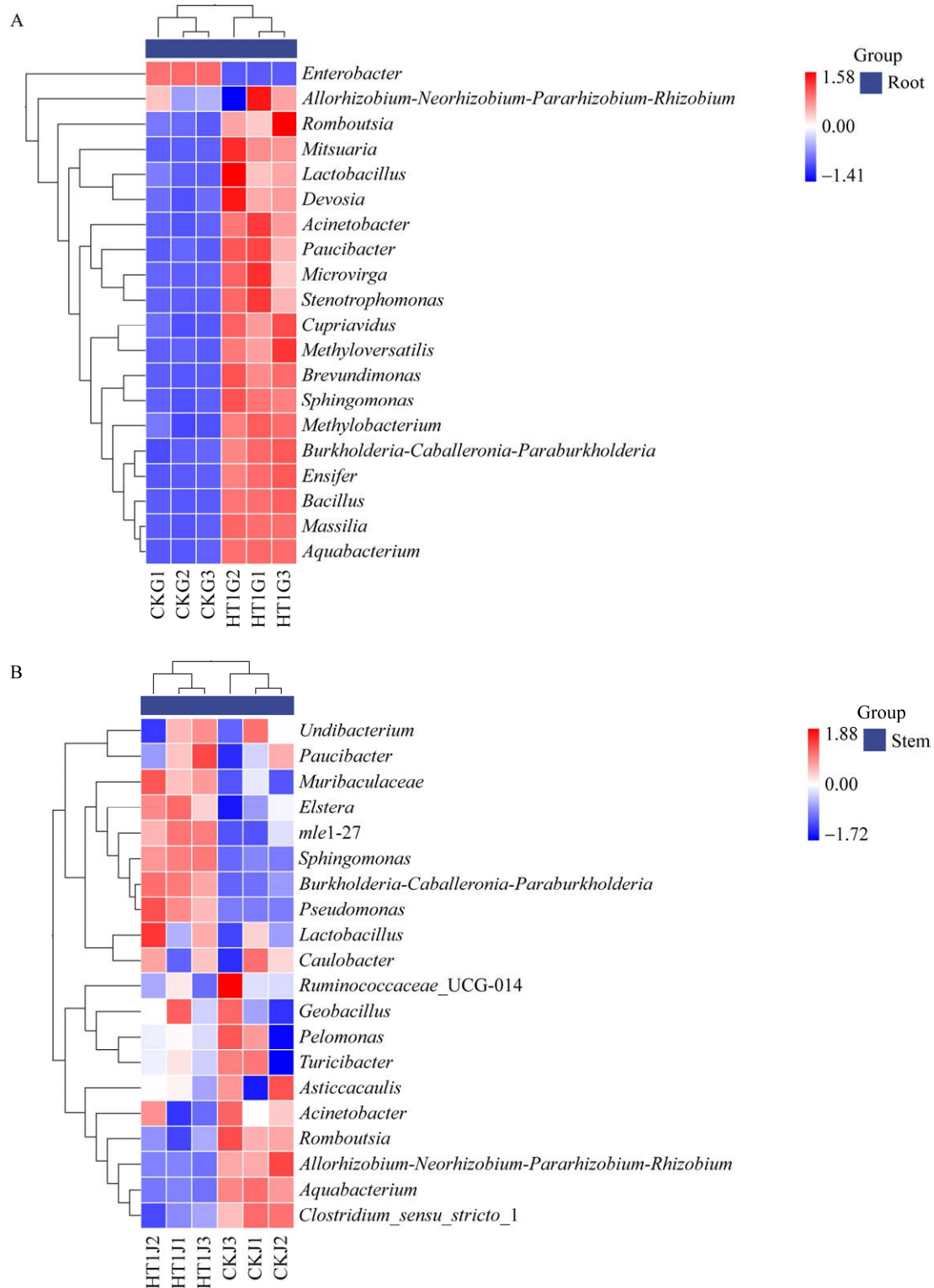


图 6 不同处理蚕豆植株内微生物属水平的物种组成热图

Figure 6 Heat map of species composition at the microbe level in faba bean plants under different treatments

注: A: 根部; B: 茎部。CK: 对照; HT1: *P. poae* HT1

Note: A: Root; B: Stem. CK: Control; HT1: *P. poae* HT1

3 讨论与结论

在自然环境下,生防微生物能否稳定生存并有效定殖于作物各组织中是发挥其生物防效的重要条件,定殖能力越强,防治病害的效果就越明显^[36-37]。与根际微生物和土壤微生物相比,内生菌由于与宿主植物长期协同进化,形成了互惠互利、相互依存的关系^[38],因此它们定殖在植物组织间受环境的影响较小,作为生防因子能发挥出更大的优势^[39]。Behrendt 等^[40]首次描述草假单胞菌;Zachow 等^[41]发现 *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 可抑制 *Rhizoctonia solani* 生长,并能产生新型脂肽 Poeamide 物质,该物质影响菌株在根部的定殖。Xia 等^[42]从柳枝稷中分离出 *Pseudomonas poae* A2-S9,该菌株显示出促进植物生长的能力。Ren 等^[43]研究发现 *Pseudomonas poae* JSU-Y1 可以抑制苹果上青霉菌的生长。前人并未对草假单胞菌在蚕豆中的定殖特性及其对蚕豆内生菌多样性的影响进行研究。本研究中内生草假单胞菌 HT1 能有效定殖于蚕豆的植株组织中,通过氨苄青霉素标记法获得标记菌株 HT1-A,用于测定蚕豆植株根茎中的菌株定殖量,灌根处理后在第 7 天定殖量达到最大,在每克根、茎、叶组织中的菌数均达到了 10^6 数量级,而且根中菌株的定殖量均高于茎、叶部位,这与高竞等^[37]得出的解淀粉芽孢杆菌 WK1 在根部定殖的菌体相比茎叶定殖更牢固的结论一致。原因可能是根部代谢旺盛时提供可利用的养分更多。另外,在第 83 天时,在每克根组织中的菌数达到 10^3 数量级,而每克茎和叶组织中的数量也达到了 10^1 数量级。由此可以得出结论,在蚕豆生长期菌株 HT1 能在蚕豆植株中长期有效定殖,为植株免受赤斑病的侵染起到保护作用,为其充分发挥生防应用奠定基础。

通过对 α 多样性的分析发现,菌株 HT1 处理下蚕豆根部和茎部内生细菌的丰富度和多样性存在明显差异:菌株 HT1 处理显著降低了蚕豆根茎部内生细菌的丰富度,显著增加了根内生细菌的物

种多样性,降低了茎内生细菌的物种多样性。这与沙月霞等^[44]的描述相一致。HT1 菌株处理后蚕豆根部内生细菌的优势菌群发生了较大的变化,厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门、绿弯菌门、*Patescibacteria*、疣微菌门、*Spirochaetes*、芽单胞菌门、*Tenericutes* 的相对丰度均有提高,其中厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门丰度显著提高;但 HT1 菌株处理后蚕豆茎部的优势菌群未发生较大的变化,仅变形菌门的相对丰度有所升高。在属水平上,HT1 菌株处理后与对照的优势菌属差异较大,但是又有一些共有的优势菌属。蚕豆根部细菌如 *Romboutsia*、*Mitsuaria*、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、德沃斯氏菌属 (*Devosia*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、*Paucibacter*、微枝形杆菌属 (*Microvirga*)、嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas*)、贪铜菌属 (*Cupriavidus*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、*Massilia*、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*) 等属的相对丰度明显升高,而肠杆菌属 (*Enterobacter*) 则相反,但根部假单胞菌 (*Pseudomonas*) 数量无明显差异,有可能假单胞菌自下而上传输;蚕豆茎部细菌如假单胞菌 (*Pseudomonas*)、*Muribaculaceae*、*Elstera*、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* 等属的相对丰度明显升高,而不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、*Romboutsia*、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*、严格梭菌属 (*Clostridium_sensu_stricto_1*) 等相对丰度明显下降。短波单胞菌属^[45]、芽孢杆菌属^[46]、*Massilia* 等^[47]被报道具有一定的促生作用。可见,草假单胞菌灌根处理在一定程度上提高了植株中具有抑菌促生功能微生物的相对丰度。

草假单胞菌 HT1 可在蚕豆植株组织内长期有效定殖,并提高了植物内生细菌的物种多样性和相关功能微生物的相对丰度,为开展蚕豆赤斑病的生物防治提供了菌种资源,也为该菌的进一步开发利用提供了依据,并为其田间应用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Tang SM. Application status of broad bean and development prospects research review[J]. Modern Business Trade Industry, 2019, 40(28): 185-186 (in Chinese)
唐世明. 蚕豆的应用现状和发展前景研究综述[J]. 现代商贸工业, 2019, 40(28): 185-186
- [2] Zheng ZJ. Chinese Edible Legumes[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1997 (in Chinese)
郑卓杰. 中国食用豆类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997
- [3] Lan JJ, Yang XJ, Dang B, Zhang J, Liu YJ. Technology optimization of procyanidins extraction and content differences and antioxidant activity evaluation of different cultivars from faba bean epispem[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(11): 2164-2174 (in Chinese)
兰佳佳, 杨希娟, 党斌, 张杰, 刘玉皎. 蚕豆皮中原花青素的提取工艺优化及品种间含量差异与抗氧化活性评价[J]. 核农学报, 2017, 31(11): 2164-2174
- [4] Huang Y, Duan CX, Lu M, Dongfang Y, Zhu ZD. Identification of the pathogens causing chocolate spot on the broad bean[J]. Plant Protection, 2012, 38(6): 115-118 (in Chinese)
黄燕, 段灿星, 陆鸣, 东方阳, 朱振东. 蚕豆赤斑病病原菌鉴定[J]. 植物保护, 2012, 38(6): 115-118
- [5] Shen L. Identification of the main diseases and control of chocolate spot by fungicides in broad bean in Jiangsu Province[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese)
沈良. 江苏省蚕豆主要病害鉴定及赤斑病药剂防治研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2014
- [6] Wang SY, Chai Q. Pathogen identification of leaf diseases and the study on the main diseases in spring broad bean in Gansu Province[J]. Journal of Plant Protection, 2000, 27(2): 121-125 (in Chinese)
王淑英, 柴琦. 甘肃省春蚕豆叶部病害病原鉴定及主要病害[J]. 植物保护学报, 2000, 27(2): 121-125
- [7] Wang XM, Zhu ZD, Duan CX, Zong XX. Identification and Control Technology of Pests and Diseases of Broad Bean and Pea[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2007 (in Chinese)
王晓鸣, 朱振东, 段灿星, 宗绪晓. 蚕豆豌豆病虫害鉴别与控制技术[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2007
- [8] Bao SY, Wang XM, Zhu ZD, Zong XX, Kumari S, Freeman A, Leur J. Survey of faba bean and field pea viruses in Yunnan Province, China[J]. Australasian Plant Pathology, 2007, 36(4): 347-353
- [9] Ye Y. Chinese Broad Bean Science[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003 (in Chinese)
叶茵. 中国蚕豆学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003
- [10] Zhao YY, Gan QF, Yu DZ, Yu XZ. Study on the main biological characteristics of the pathogen of broad bean brown spot[J]. Hubei Agricultural Sciences, 1991, 30(10): 31-33 (in Chinese)
赵永玉, 甘启芳, 喻大昭, 喻小珍. 蚕豆褐斑病菌主要生物学特性研究[J]. 湖北农业科学, 1991, 30(10): 31-33
- [11] Du CZ, Long JC, Gong WZ, Zhu ZD, Zong XX, Zhang JJ. Analysis of major genes plus polygenes mixed inheritance for resistance to chocolate spot on faba bean[J]. Plant Protection, 2019, 45(6): 131-137 (in Chinese)
杜成章, 龙珏臣, 龚万灼, 朱振东, 宗绪晓, 张继君. 蚕豆赤斑病抗性的主基因+多基因遗传分析[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 131-137
- [12] Li L, Zhang Y, Guo YP, Shao Y, Yang YH. Control effect of eight fungicides on spring broad bean chocolate spot[J]. Plant Protection, 2019, 45(3): 245-248 (in Chinese)
李龙, 张芸, 郭延平, 邵扬, 杨彧红. 8种杀菌剂对春蚕豆赤斑病的防治效果[J]. 植物保护, 2019, 45(3): 245-248
- [13] Su Q. Analysis of the advantages and disadvantages of chemical control and biological control[J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2011, 39(6): 84-85, 132 (in Chinese)
苏琴. 化学防治与生物防治的优缺点浅析[J]. 内蒙古农业科技, 2011, 39(6): 84-85, 132
- [14] Lou HB, Wang XB, Chen J, Wang W. Isolation and identification of bacterium strain SN15-2 against *Ralstonia solanacearum* and analysis on its bio-control ability[J]. China Plant Protection, 2019, 39(3): 12-18 (in Chinese)
娄海博, 王晓冰, 陈俊, 王伟. 拮抗青枯劳尔氏菌的荧光假单胞菌 SN15-2 分离鉴定及其生防能力分析[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(3): 12-18
- [15] Sahu B, Singh J, Shankar G, Pradhan A. *Pseudomonas fluorescens* PGPR bacteria as well as biocontrol agent: a review[J]. International Journal of Chemical Studies, 2018, 6(2): 1-7
- [16] David BV, Chandrasehar G, Selvam PN. *Pseudomonas fluorescens*: A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) with Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops[M]. Crop Improvement Through Microbial Biotechnology. Amsterdam: Elsevier, 2018: 221-243
- [17] Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63: 541-556
- [18] Kamilova F, Validov S, Azarova T, Mulders I, Lugtenberg B. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(11): 1809-1817
- [19] Lin QL, Lu NH, He H, Yuan Y. Colonization dynamics and growth promotion effect of marine bacterium strain SH-27 in soybean and its biological control effect on *Phytophthora*

- root rot disease[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(2): 240-246 (in Chinese)
- 林巧玲, 卢乃会, 何红, 袁越. 海洋细菌解淀粉芽胞杆菌 SH-27 在大豆体内的定殖动态及促生防病作用[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(2): 240-246
- [20] Jiao R, He PF, Wang G, Wu YX, Wang JW, Tang P, Yang HW, He YQ. Colonization and control effect on tobacco powdery mildew of endophyte YN201728[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(4): 721-728 (in Chinese)
- 焦蓉, 何鹏飞, 王戈, 吴毅歆, 王军伟, 唐萍, 杨焕文, 何月秋. 内生菌 YN201728 的定殖能力及其防治烟草白粉病的效果研究[J]. 核农学报, 2020, 34(4): 721-728
- [21] Wang HX, Liu ZP, Wang ZG, Xu WH, Guo RX. Colonization and growth promotion of three *Bacillus* strains in rice rhizosphere and their survival in soil[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2019, 35(7): 892-899 (in Chinese)
- 王恒煦, 刘泽平, 王志刚, 徐伟慧, 郭茹鑫. 3 株芽胞杆菌在水稻根际定殖促生及其在土壤中的存活[J]. 生态与农村环境学报, 2019, 35(7): 892-899
- [22] Zhang H, Du J, Zhao SF. Functional analysis of antibacterial compound synthesis *ituD* in *Bacillus subtilis* S44[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(10): 2281-2285 (in Chinese)
- 张慧, 杜娟, 赵思峰. 枯草芽胞杆菌 S44 抑菌化合物合成关键基因 *ituD* 的功能分析[J]. 西南农业学报, 2020, 33(10): 2281-2285
- [23] Yao JA, Huang P, Hou XY, Yu DY. Colonization dynamics marine bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* BA-3 and its impact on the microbial community of *Cymbidium* rhizosphere[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(6): 915-921 (in Chinese)
- 姚锦爱, 黄鹏, 侯翔宇, 余德亿. 海洋细菌解淀粉芽胞杆菌 BA-3 在兰花的定殖及对根际微生态的影响[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(6): 915-921
- [24] Hu KH, Luo QG, Wang SH, Lin X, Lin WX. Effects of allelopathic rice on rhizosphere microbial flora and enzyme activity[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(6): 1060-1064 (in Chinese)
- 胡开辉, 罗庆国, 汪世华, 林旋, 林文雄. 化感水稻根际微生物类群及酶活性变化[J]. 应用生态学报, 2006, 17(6): 1060-1064
- [25] Wang T, Duan YJ, Liu BT, Guo G, Zhou DB, Tan X, Zhang XY, Huang MJ. The colonization of two strains of antagonistic bacteria of *Fusarium oxysporum* in banana[J]. Genomics and Applied Biology, 2011, 30(3): 342-350 (in Chinese)
- 汪腾, 段雅婕, 刘兵团, 郭刚, 周登博, 谭昕, 张锡炎, 黄绵佳. 两株香蕉枯萎病拮抗菌在香蕉体内的定殖[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(3): 342-350
- [26] He H, Qiu SX, Cai XQ, Guan X, Hu FP. Colonization in plants and identification of endophytic bacteria BS-1 and BS-2 from *Capsicum annuum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(1): 13-18 (in Chinese)
- 何红, 邱思鑫, 蔡学清, 关雄, 胡方平. 辣椒内生细菌 BS-1 和 BS-2 在植物体内的定殖及鉴定[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 13-18
- [27] Li S, Zuo SW, Wang WQ, Wang JS, Quan CW, Zhu XZ. Determining the effects of *Serratia* sp. on *Pyrene* removal and the endophytic bacterial community in ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) via different inoculation methods[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2018, 37(12): 2755-2764 (in Chinese)
- 李爽, 左尚武, 王万清, 王金嵩, 权成伟, 朱雪竹. 菌株 *Serratia* sp. 不同定殖方式对黑麦草中芘污染去除及其内生菌群的影响[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(12): 2755-2764
- [28] Liu XJ, Zhu J, Chu M, Tang QY, Gu MY, Wang B, Zhu X, Zhang ZD. Changes in carbon metabolism characteristics and community composition of endophytic bacteria in postharvest kuqa-grown apricot[J]. Food Science, 2018, 39(22): 141-146 (in Chinese)
- 刘晓静, 朱静, 楚敏, 唐琦勇, 顾美英, 王博, 朱璇, 张志东. 库车小白杏采后内生细菌群落代谢特征及结构组成的变化[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 141-146
- [29] Xia F, Liu Y, Shen GR, Guo LX, Zhou XW. Investigation and analysis of microbiological communities in natural *Ophiocordyceps sinensis*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2015, 61(2): 104-111
- [30] He AL, Sun JN, Wang XH, Zou LW, Fu B, Chen J. Reprogrammed endophytic microbial community in maize stalk induced by *Trichoderma asperellum* biocontrol agent against *Fusarium* diseases and mycotoxin accumulation[J]. Fungal Biology, 2019, 123(6): 448-455
- [31] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200
- [32] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461
- [33] Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population[J]. Scandinavian Journal of Statistics, 1984, 4(11): 265-270
- [34] Shannon CE. A mathematical theory of communication[J]. The Bell System Technical Journal, 1948, 27(3): 379-423
- [35] Simpson EH. Measurement of diversity[J]. Nature, 1949, 163(4148): 688
- [36] Weller DM. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria[J]. Annual Review of Phytopathology, 1988, 26(1): 379-407

- [37] Gao J, Fang W, Gu JY, Yan SX, Shao S, Liang CF, Qin H, Chen JH, Xu QF. Colonization of fluorescently labeled *Bacillus amylolyticus* WK1 in *Carya cathayensis* Sarg. and soil[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2021, 33(1): 77-86 (in Chinese)
高竞, 方伟, 顾佳悦, 严淑娴, 邵帅, 梁辰飞, 秦华, 陈俊辉, 徐秋芳. 荧光标记解淀粉芽孢杆菌 WK1 在山核桃树体和土壤中的定殖规律[J]. *浙江农业学报*, 2021, 33(1): 77-86
- [38] Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 278(1): 1-9
- [39] Hu Z, Lei P, Guo ZH, Yang H, Xiao R, Luo RJ, Huang J, Fu ZJ. Fluorescent marker of biocontrol actinomycetes Ahn75 and its colonization in rice[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2612-2619 (in Chinese)
胡展, 雷平, 郭照辉, 杨华, 肖蓉, 罗璐君, 黄军, 付祖姣. 生防放线菌 Ahn75 的荧光标记及其在水稻中的定殖[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2612-2619
- [40] Behrendt U, Ulrich A, Schumann P. Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(Pt 5): 1461-1469
- [41] Zachow C, Jahanshah G, De Bruijn I, Song CX, Ianni F, Pataj Z, Gerhardt H, Pianet I, Lämmerhofer M, Berg G, et al. The novel lipopeptide poeamide of the endophyte *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 is involved in pathogen suppression and root colonization[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2015, 28(7): 800-810
- [42] Xia Y, DeBolt S, Ma Q, McDermaid A, Wang CK, Shapiro N, Woyke T, Kyrpides NC. Improved draft genome sequence of *Pseudomonas poae* A2-S9, a strain with plant growth-promoting activity[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2019, 8(15): e00275-19. DOI: 10.1128/MRA.00275-19
- [43] Ren Y, Yao M, Chang PP, Sun YM, Li R, Meng D, Xia XS, Wang Y. Isolation and characterization of a *Pseudomonas poae* JSU-Y1 with patulin degradation ability and biocontrol potential against *Penicillium expansum*[J]. *Toxicon*, 2021, 195: 1-6
- [44] Sha YX, Shen RQ. Impact of seed soaked by *Bacillus* on endophytic bacterial community structure of rice[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(22): 8442-8451 (in Chinese)
沙月霞, 沈瑞清. 芽孢杆菌浸种对水稻内生细菌群落结构的影响[J]. *生态学报*, 2019, 39(22): 8442-8451
- [45] Tong WJ, Zhang L, Xue QY, Hou BW, Ding XY. Isolation of endophytic bacteria in *Dendrobium loddigesii* collected from different locations and comparison on their plant-growth-promoting potential[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2014, 23(1): 16-23 (in Chinese)
童文君, 张礼, 薛庆云, 侯北伟, 丁小余. 不同产地美花石斛内生细菌分离及促生潜力比较[J]. *植物资源与环境学报*, 2014, 23(1): 16-23
- [46] Xing FF, Gao MF, Hu ZP, Fan LC. The control and growth-promoting effect of a biocontrol *Bacillus* on cucumber root-knot nematode and its identification[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(8): 101-103 (in Chinese)
邢芳芳, 高明夫, 胡兆平, 范玲超. 1 株生防芽孢杆菌对黄瓜根结线虫的防治、促生作用及其鉴定[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(8): 101-103
- [47] Guo YZ, Ding XM, Yao L, Xu DM, Zhao YJ, Feng FY, Meng JY. Isolation and identification of *Massilia* sp. B260 and its effect on seedling raising[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(9): 144-149 (in Chinese)
郭宇泽, 丁雪敏, 姚岚, 许德敏, 赵雨洁, 冯福应, 孟建宇. 马西利亚菌 B260 的分离鉴定及促进育苗的效果[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(9): 144-149