

黄博闻, 王 亚, 葛 静, 等. 水稻组织中可培养内生细菌的分离鉴定及功能分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(4): 1145-1148.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.04.034

水稻组织中可培养内生细菌的分离鉴定及功能分析

黄博闻^{1,2}, 王 亚¹, 葛 静^{1,2}, 孙 星¹, 王冬兰¹, 余向阳^{1,2}

(1. 江苏大学环境与安全工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 省部共建国家重点实验室培育基地——江苏省食品质量安全重点实验室/江苏省农业科学院, 江苏 南京 210014)

关键词: 水稻; 可培养内生菌; 功能多样性; 水稻内生菌资源库

中图分类号: S511; Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)04-1145-04

Isolation, identification and functional analysis of culturable endophytic bacteria in rice tissue

HUANG Bo-wen^{1,2}, WANG Ya¹, GE Jing^{1,2}, SUN Xing¹, WANG Dong-lan¹, YU Xiang-yang^{1,2}

(1. School of Environmental and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base, Ministry of Science and Technology/Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Key words: rice; culturable endophytic bacteria; functional diversity; rice endophyte resource bank

内生细菌是指可以在植物内部组织中定殖的, 不会造成任何直接的、明显的负面影响的细菌^[1-2]。内生细菌广泛分布于植物的各个组织中, 如根、茎、叶、种子等的细胞或细胞间隙^[3], 甚至在植物的根瘤中也存在^[4]。

内生菌参与调控水稻众多生理活动^[5]。利用内生菌促进植物生长、增强作物抗病能力、减轻污染胁迫是实现水稻优质高产的有效方法^[6]。Feng 等^[7]发现施用含促生与有机污染物降解功能的内生菌可显著提高水稻生物量, 同时减少水稻对有机污染物的富集。研究表明, 植物内生菌可通过分泌次生代谢物诱导水稻自身抗性的形成^[8]或直接应对病原体^[9]。Haruna 等^[10]发现 *Sphingomonas melonis* 通过产生邻氨基苯甲酸干扰水稻种子病原菌 *Burkholderia plantarii* 的 σ 因子 RpoS, 从而抑制毒力因子合成。此外, 一些有益内生菌还可以通过水稻种子跨代传播^[11], 它们在促进植物种子萌发、根毛形成、诱导水稻幼苗抗病性等方面发挥重要作用^[12]。

水稻内生细菌群落分布与组成受环境因子^[13]、水稻品种与生长期^[14]等因素影响。研究表明, 分蘖期的水稻内生菌多样性丰富, 分布均匀^[14]。因此, 研究不同地区不同品种水稻分蘖期的内生菌分布, 有助于了解水稻与内生菌互作关系, 有利于更好地将内生菌应用于农业, 实现减少化肥施用、减少农药施用、修复土壤环境等目标^[15], 推动农业的绿色可持续发展。目前, 有关江苏省主要水稻品种中内生菌群落分布的研究尚无报道, 对不同品种水稻内生菌种库的构建也鲜有报道。本研究对江苏 33 个水稻品种分蘖期的根和茎叶中的内生菌进行分离、鉴定和分析, 初步构建了不同品种水稻内生菌种资源库, 为挖掘水稻微生物资源, 促进水稻育种发展提供了资源和依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试验药品: 胰蛋白酶大豆肉汤培养基(TSB)与琼脂(青岛海博生物技术有限公司产品), 次氯酸钠(AR, 天茂化工有限公司产品); 95%乙醇(南京寿德生物有限公司产品)。

仪器: 上海知楚 ZQZY-90F 振荡培养箱, Eppendorf Centrifuge 5804R 高速离心机, 苏净 SW-CJ-1D 超净工作台。

收稿日期: 2021-11-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872002, 31772197)

作者简介: 黄博闻(1996-), 男, 江苏无锡人, 硕士研究生, 研究方向为农业环境。(E-mail) 609939306@qq.com

通讯作者: 葛 静, (E-mail) gejing@jaas.ac.cn; 余向阳, (E-mail) yuxy@jaas.ac.cn

1.2 试验材料

分蘖期水稻植株采自江苏省农业科学院粮食作物研究所试验田,所采集样品来自同一片区域,样品取回后储存于 4℃ 冰箱中,于 2 d 内完成样品处理。

水稻品种:丰梗 3227、沪软 1212、华梗 5、华梗 8 号、淮梗 5 号、金梗 818、金香玉 2 号、连梗 11、连梗 15、南梗 45、南梗 46、南梗 47、南梗 49、南梗 5055、南梗 9108、宁梗 8 号、日本晴、苏沪香梗、苏香梗 100、苏香梗 2 号、苏秀 867、皖垦梗 11036、武育梗 3 号、武育梗 80 号、武运梗 27 号、武运梗 29 号、徐稻 3、盐梗 16、扬梗 3012、扬梗 3491、扬梗 4227、扬育梗 2 号、镇稻 18 号、镇稻 99。

1.3 样品收集与表面消毒

将采集的水稻植株用蒸馏水洗净,每个品种随机取 3~5 株。用剪刀将水稻分为根与茎叶两部分并立即进行表面消毒,方法参考文献[5]:采用 75% 酒精浸没样品 2 min,采用 3% 次氯酸钠浸没 2 min,每次弃去溶液后用无菌水润洗 3 次。最后 1 次灭菌水涂布于 LB 固体平板,验证灭菌效果。向装有经过消毒的水稻组织样品的离心管中加入 2 颗灭菌磁珠,然后使用往复式震荡机在 750 r/min 频率下研磨 20 min 获得组织匀浆液。

1.4 菌种分离纯化与保存

取 0.5 ml 匀浆液用无菌水进行 4 倍稀释,并移取 100 μ l 稀释液涂布于 TSB 固体平板,每个品种 3 次重复,并置于 30℃ 恒温培养箱。挑选平板中的单菌落进行划线直至获得纯化菌种。

20% 甘油菌液制备:吸取 0.5 ml 纯化菌种菌液与 40% 甘油冻存于 -80℃ 冰箱。

1.5 菌种鉴定与数据处理

正向引物 25F:5'-AACTGAAGAGTTTGATCCTGGCTC-3'; 反向引物 1492R:5'-TACGGCTACCTTGTACGACT-3'。PCR 反应条件参考文献[16]。扩增产物送南京通用生物公司测序,所得序列拼接后在 GenBank 数据库中进行比对,将菌株序列相似度>98% 的归为同一种。

采用 Origin pro 绘图,采用 Excel 统计数据;不同品种水稻的抗病能力及亲本信息参考 <https://www.ricedata.cn/>。

2 结果与分析

2.1 可培养内生细菌

经测序鉴定后,从 33 个水稻品种中共获得 119 株可培养内生细菌,其中根中分离出的内生细菌 77 株,茎叶中分离出的内生细菌 39 株,3 株未定义,共涉及 19 个属,从分类水平看,根部分离出的内生菌数量明显高于茎叶部($P < 0.05$)。

2.2 不同品种水稻优势内生菌

为探究不同品种中优势内生菌,对分离出的 119 株内生菌进行属水平分类,共可分为 18 个菌属:不动杆菌属(*Acinetobacter*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)、

节杆菌属(*Arthrobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、贪铜菌属(*Cupriavidus*)、纤维菌属(*Cellulosimicrobium*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、假芽孢杆菌属(*Fictibacillus*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、地杆菌属(*Terrabacter*)。其中,*Bacillus*、*Aeromonas* 和 *Exiguobacterium* 在水稻组织中出现频次最高,分别占 26%、19% 和 16%。属水平统计结果显示,芽孢杆菌属在水稻内生菌属中占比最高。对该属中 32 株细菌进行菌种分析发现,巨大芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌是主要菌种,分别占总芽孢杆菌菌群的 19%、13% 和 6%。

2.3 水稻不同器官优势内生菌属

对各品种水稻组织中分离出的菌属进行统计,从水稻根部分离得到 16 种菌属,其中优势菌属(占比>10%)依次为 *Bacillus* (31%)、*Aeromonas* (17%) 和 *Exiguobacterium* (15%);从水稻茎叶部分离得到 10 种菌属,优势菌属依次为 *Aeromonas* (28%)、*Bacillus* (20%)、*Exiguobacterium* (18%) 和 *Microbacterium* (13%)。其中,根与茎叶中共有菌属 6 种,分别为 *Bacillus*、*Aeromonas*、*Exiguobacterium*、*Microbacterium*、*Arthrobacter* 和 *Enterobacter*。

2.4 亲本水稻品种内生菌与后代水稻品种内生菌的关系

33 个品种中有 8 个品种存在亲缘关系,分析发现,亲本水稻品种(镇稻 99、徐稻 3 号、南梗 46、武育梗 3 号)与各自的杂交后代水稻品种(扬梗 3491、扬育梗 2 号、沪软 1212、淮梗 5 号)至少存在 1 种或 2 种共有内生菌。其中,在母本镇稻 99 与后代品种扬梗 3491 之间发现共有内生菌 *Microbacterium laevaniformans* strain;在父本徐稻 3 号与后代品种扬育梗 2 号间发现共有内生菌 *Microbacterium laevaniformans* strain,在父本南梗 46 与后代品种沪软 1212 间发现共有内生菌 *Bacillus cereus* strain,在母本武育梗 3 号与后代品种淮梗 5 号间发现共有内生菌 *Exiguobacterium* sp. 和 *Bacillus* sp.。

2.5 不同品种水稻中抗病菌属分布

水稻中已被广泛报道的具有抗病能力的内生细菌属主要为 *Bacillus*、*Lysinibacillus* 和 *Pseudomonas*。苏沪香梗中分离出了最多数量的 *Bacillus* 内生菌,这可能在一定程度上与其优良的抗叶枯病和抗稻瘟病的特性相关。其他 17 个品种中都分离出 1~2 种可能与抗病相关的菌属,*Bacillus* 在 18 个品种中分布相比其他抗病菌属更广。

3 讨论

3.1 33 个水稻品种中内生菌组成的多样性

研究结果显示,33 个水稻品种中的内生菌共涉及 4 个菌门:变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)。其中,2 个核心菌门(厚壁菌门与变形菌门)在各品种中共存。这与相

关研究结果^[17-18]一致,符合水稻组织中常见菌群组成规律。本研究中,多个品种中厚壁菌门占比高于变形菌门。厚壁菌门被认为具有降解大分子有机物(如蛋白质、脂质、纤维素等)的功能^[19],这与水稻样品收集区域大规模施用有机肥有密切关系,厚壁菌门的升高有助于土壤中有机质的分解利用^[20]。变形菌门主要参与固氮,较高的丰度有助于水稻土壤肥力的保持^[21]。

从属水平看,本研究发现同一区域内不同品种中优势内生细菌具有相似性。在长期的自然选择中,具有优异功能的内生菌更容易被不同品种选择^[22],这些内生菌通过增加植物的养分摄入量及影响植物激素的释放^[23],在与植物的互动中占据有利生态位,从而避免在根际土与叶际等外部环境与其他微生物竞争^[24]。其中,*Bacillus*、*Aeromonas* 和 *Exiguobacterium* 作为常见优势菌群在南京 33 个水稻品种中广泛分布,这与菌属自身具有的有益功能密不可分。*Bacillus* 被广泛报导具有抗逆、促生以及良好的生防功能^[25-26]。从分布看,芽孢杆菌在水稻根内分布更广,这与相关报导^[27]一致。本研究结果表明,分离出的芽孢杆菌菌种主要包括枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌。枯草芽孢杆菌具有生防特性^[26],能够降解塑化剂等有机污染物^[28];蜡状芽孢杆菌兼具解钾促生功能^[29],可促进水稻营养代谢;巨大芽孢杆同时具备溶磷功能^[30],后两者可能是水稻根部营养吸收的重要菌群,而前者为水稻抗病提供了保障。*Exiguobacterium* 被认为具有耐受寒冷与盐碱^[31]等极端环境的特性,拥有还原铬、砷等具有毒性的重金属离子的能力^[32],具有降解农药、苯及其同系物等有机化合物的活性。*Exiguobacterium* 的协同作用会使 *Bacillus* 反硝化能力显著提高。*Aeromonas* 是常见的耐盐菌属^[33],具有反硝化和除磷功能^[34],从分布看,*Aeromonas* 倾向于定殖于水稻叶内,在多种水稻品种中占比达 28%。总之,3 种菌属对水稻生长发挥了巨大作用,且菌属之间存在协同效应,是水稻生产中最有应用潜力的菌属。

3.2 亲本水稻品种内生菌与杂交后代水稻品种内生菌的关联

植物利用种子作为载体,通过垂直传播保留部分具有重要生态学功能的内生菌,使后代继承由内生菌赋予的优势^[35]。本研究发现,后代水稻品种中分离出的内生菌可以追溯到 1 个亲本中的 1 种或 2 种,这与相关研究结果^[36]一致。Liu 等^[37]研究了分蘖期超级杂交稻与其亲本间内生菌群落组成发现,3 种水稻内生菌群落组成与结构虽然存在差异,但后代水稻品种中优势菌属与亲本保持一致。Hardoim 等^[38]研究发现,在第二代种子中发现了来自第一代水稻种子中 45% 的细菌群落。垂直传播的种子内生菌对作物抗性组成、环境适应性与生长具有重大影响^[39]。本研究中 *Microbacterium laevaniformans* strain 的垂直传播在水稻品种中多次被发现,它具有耐金属、耐硝酸盐和适应低 pH 值的特

性,有助于后代水稻品种更快地适应当地环境。Liu 等^[40]发现,来自种子中的内生菌可随水稻生长定殖于植物根部并通过分泌次生代谢物提高水稻对镉污染的抗性。禾本科的一些垂直传播真菌内生菌可以赋予宿主特殊生物碱阻止食草动物的采食或增加营养成分^[41-42]。已有研究结果表明,内生菌通过垂直传播的方式从亲本植物传递到后代会使后代具有比水平传播模式更高的环境适应潜力,因为在水平传播模式下,植物需要从环境中重新招募相关微生物^[39]。后代水稻品种可从种子中获得来自亲本的优势菌属,也可从土壤中再次选择性招募相似菌属^[11]。相关研究结果表明,即使在不同地点重新培养后,许多相似的内生菌群仍然存在于后代水稻品种中^[36]。这表明,在长期的协同进化中,来自亲本的生物信息或资源可能有助于内生菌在其后代中的形成^[39],促使后代水稻品种从土壤中招募相似的有益内生菌。

尽管水稻内生细菌组成受到基因型、发育阶段等诸多因素影响,但是同一区域内不同品种水稻中仍然存在一些核心内生菌,本试验 33 个水稻品种中常见核心内生菌群为 *Aeromonas*、*Exiguobacterium*、*Bacillus* 和 *Microbacterium*。至于这些内生菌如何与水稻互作发挥功能仍有待进一步研究。本研究结果丰富了水稻内生菌种库。

参考文献:

- [1] MITTER B, BRADER G, PFAFFENBICHLER N, et al. Next generation microbiome applications for crop production-limitations and the need of knowledge-based solutions [J]. Current Opinion in Microbiology, 2019, 49: 59-65.
- [2] ULLAH A, FAHAD S, MUNIS F H. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review [J]. Environmental and Experimental Botany, 2015, 117: 28-40.
- [3] 刘晓静,梁幸豪,朱静,等.库车小白杏仁内生细菌的筛选及其功能特性初探[J].中国食品学报,2021,21(6):280-286.
- [4] 姚领爱,胡之璧,王莉莉,等.植物内生菌与宿主关系研究进展[J].生态环境学报,2010,19(7):1750-1754.
- [5] 梁振霆,唐婷.内生菌对植物次生代谢产物的生物合成影响和抗逆功能研究[J].生物技术通报,2021,37(8):35-45.
- [6] 刘彦策,王会敏,钱欣雨,等.玉米内生菌 L10 的分离、鉴定及拮抗活性[J].植物保护学报,2021,48(3):630-637.
- [7] FENG N X, LIANG Q F, FENG Y X, et al. Improving yield and quality of vegetable grown in PAEs-contaminated soils by using novel bioorganic fertilizer [J]. Science of The Total Environment, 2020, 739: 139883.
- [8] 杨波,陈晏,李霞,等.植物内生菌促进宿主氮吸收与代谢研究进展[J].生态学报,2013,33(9):2656-2664.
- [9] 张志斌,邓映明,熊瑶瑶,等.东乡野生稻内生放线菌分离及菌株 S123 次级代谢产物分析[J].微生物学通报,2015,42(9):1662-1670.
- [10] HARUNA M, XIAOYAN F, YUE W, et al. Bacterial seed endophyte shapes disease resistance in rice [J]. Nature Plants, 2021,

- 7(1): 60-72.
- [11] 王志山,黎妮,王伟平,等. 水稻种子内生细菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38(1): 236-246.
- [12] 谢红炼,汪汉成,史彩华,等. 烟草种子内生真菌群落结构和多样性分析[J]. 中国烟草科学, 2021, 42(2): 28-36.
- [13] 毛光瑞,翟梅枝,史冠昭,等. 陕西不同生境核桃内生真菌多样性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1262-1273.
- [14] 王雪君,贾瑞宗,郭运玲,等. 水稻 4 个生长时期茎部可培养内生菌多样性分析[J]. 热带作物学报, 2015, 36(6): 1078-1085.
- [15] 杨刚,余仲东,赵世伟,等. 糜子溶磷内生真菌的筛选及其鉴定[J]. 水土保持通报, 2020, 40(4): 124-132.
- [16] 胡文哲,谭泽文,王勇,等. 藤县药用野生稻内生固氮菌分离鉴定及系统发育分析[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6): 111-119.
- [17] 林美芬,郑毅,王晓彤,等. 富炭硅肥对水稻土铁还原菌群落特征的影响[J]. 中国环境科学, 2021, 41(4): 1778-1789.
- [18] 严婷婷,赵艳,王超霞,等. 水稻种子内生细菌 16S rDNA 基因高通量测序 PCR 引物筛选和菌群结构分析[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(2): 316-326.
- [19] 关孟欣,彭兰生,陈景阳,等. 玉米芯生物炭对污泥蚯蚓粪中微生物种群及 ARGs 的影响[J]. 中国环境科学, 2021, 41(6): 2744-2751.
- [20] 李金业,陈庆峰,李青,等. 黄河三角洲滨海湿地微生物多样性及其驱动因子[J]. 生态学报, 2021, 41(15): 6103-6114.
- [21] 王晓彤,靳振江,周军波,等. 龙脊稻作梯田土壤细菌群落结构和功能类群及影响因子分析[J]. 农业资源与环境学报, 2021, 38(3): 365-376.
- [22] 许国琪,刘怡萱,曹鹏熙,等. 基于 Illumina MiSeq 测序技术对冰川棘豆(*Oxytropis glacialis*)不同组织内生菌多样性的研究[J]. 生态学报, 2021, 41(12): 4993-5003.
- [23] ALI M, ALI Q, SOHAIL M A, et al. Diversity and taxonomic distribution of endophytic bacterial community in the rice plant and its prospective[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(18): 747-756.
- [24] 刘丽辉,彭桂香,黄淑芬,等. 落地生根内生固氮菌多样性和促生特性[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2538-2547.
- [25] 王秋颖,王娜,刘颖,等. 松嫩平原芦苇湿地退化与修复过程中土壤细菌和甲烷代谢微生物的群落结构[J]. 环境科学, 2021, 42(10): 4968-4976.
- [26] 李法喜,段廷玉. 真菌和有益微生物联合防治植物病害研究进展[J]. 中国草地学报, 2021, 43(8): 93-105.
- [27] 史玉倩,赵艳. 水稻种子内生泛菌促进小球藻生长和油脂积累[J]. 中国农业科学, 2016, 49(8): 1429-1442.
- [28] 刘仁绿,连宾. 白酒塑化剂及食品安全分析[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(5): 220-226.
- [29] 付学鹏,吴凤芝,吴瑕,等. 间套作改善作物矿物质营养的机理研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2016, 22(2): 525-535.
- [30] 魏畅,戚秀秀,吴越,等. 砂质潮土高效溶磷菌的筛选鉴定、条件优化及应用[J]. 生物技术通报, 2021, 37(4): 85-95.
- [31] 孙鑫鑫,刘惠荣,冯福应,等. 乌梁素海富营养化湖区浮游细菌多样性及系统发育分析[J]. 生物多样性, 2009, 17(5): 490-498.
- [32] 魏永洋,宋文娟,李文锋,等. 应用单针注射等微量热量滴定法检测尿素水解菌对 Hg^{2+} 的耐受性[J]. 微生物学通报, 2017, 44(11): 2760-2766.
- [33] 张帅,邱鹏,龙秀峰,等. 一株具有抗菌活性耐盐芽孢杆菌 B-11 的分离鉴定及发酵工艺优化[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(7): 531-537, 540.
- [34] 蒋志云,韦佳敏,缪新年,等. ABR-MBR 工艺反硝化除磷微生物群落特征分析[J]. 环境工程学报, 2019, 13(7): 1653-1661.
- [35] 初龙,李伟,李欣亚,等. 重金属超富集植物种子内生真菌多样性及其重金属抗性[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 43-49.
- [36] WALITANG D I, CHAN-GI K, SUNYOUNG J, et al. Conservation and transmission of seed bacterial endophytes across generations following crossbreeding and repeated inbreeding of rice at different geographic locations[J]. Microbiologyopen, 2018(8): 1-13.
- [37] LIU Y, XU P P, YANG F Z, et al. Composition and diversity of endophytic bacterial community in seeds of super hybrid rice Shengliangyou 5814 (*Oryza sativa* L.) and its parental lines[J]. Plant Growth Regulation, 2019, 87(2): 257-266.
- [38] HARDOIM P R, HARDOIM C C P, VAN OVERBEEK L S, et al. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30438.
- [39] GUNDEL P E, RUDGERS J A, WHITNEY K D. Vertically transmitted symbionts as mechanisms of transgenerational effects[J]. American Journal of Botany, 2017, 104(5): 787-792.
- [40] LIU Y P, TAN H M, CAO L X, et al. Rice sprout endophytic *Enterobacter* sp. SE-5 could improve tolerance of mature rice plants to salt or Cd^{2+} in soils[J]. Archives of Agronomy and Soil Science, 2020, 66(7): 873-883.
- [41] CLAY K, SCHARDL C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses[J]. The American Naturalist, 2002, 160(S4): 99-127.
- [42] SCHARDL C L. The epichloae, symbionts of the grass subfamily poideae I[J]. Annals of the Missouri Botanical Garden, 2010, 97(4): 646-665.

(责任编辑:陈海霞)