



嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种对盐胁迫下水稻根系内生菌群落结构的影响

沙月霞*

宁夏农林科学院植物保护研究所, 宁夏 银川 750011

沙月霞. 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种对盐胁迫下水稻根系内生菌群落结构的影响. 微生物学报, 2022, 62(5): 1919–1935.

Sha Yuexia. Effects of soaking seeds with *Pseudomonas alcaliphila* Ej2 on endophytic community of rice roots under salt stress. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1919–1935.

摘要:【目的】为明确假单胞菌(*Pseudomonas*)浸种对盐胁迫下水稻根系内生菌群落多样性及结构的影响。【方法】提取宁粳 61 号根系内生细菌和内生真菌的总 DNA 后, 利用高通量测序技术检测了水稻幼苗根系内生细菌的 V5–V7 高变区 16S rRNA 基因和内生真菌的 ITS1–ITS2 区 ITS 基因序列, 分析了假单胞菌浸种处理对盐胁迫下水稻根系内生菌的微生物生态调控作用。【结果】结果表明, 嗜碱假单胞菌(*P. alcaliphila*) Ej2 浸种处理可以显著提高盐胁迫下水稻幼苗根系内生细菌和内生真菌群落的多样性、丰富度和均匀度, 增加了内生菌门、纲、目、科、属和分类单元 OTU (operational taxonomic units) (序列数 ≥ 5)的数量; 增加内生细菌中拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和放线菌门(*Actinobacteria*)的丰度, 增加率分别达 45.97%和 9.55%, 降低了厚壁菌门(*Firmicutes*)丰度, 降低率为 12.22%; 显著降低内生真菌中子囊菌门(*Ascomycota*)的丰度, 降低率为 17.96%, 显著增加被孢霉门(*Mortierellomycota*)和油壶菌门(*Olpidiomyces*)的丰度, 油壶菌门是假单胞菌浸种处理后的独有真菌门。嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种增加了盐胁迫下水稻幼苗根系内生细菌中假单胞菌属、根瘤菌属(*Allorhizobium*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和德沃斯氏菌属(*Devosia*)的丰度; 降低了内生真菌中光黑壳属(*Preussia*)、裂壳属(*Schizothecium*)、镰孢菌(*Fusarium*)、曲霉属(*Aspergillus*)和 *Monosporascus* 的丰度, 油壶菌属(*Olpidium*)是假单胞菌浸种处理后的独有真菌属; 对内生细菌种水平的影响表现为增加了施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)、嗜碱假单胞菌、未分类假单胞菌及根瘤菌(*Rhizobium*)、不能

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金(2020AAC03317); 宁夏回族自治区青年拔尖人才培养工程

Supported by the Natural Science Foundation Project of Ningxia Hui Autonomous Region (2020AAC03317) and by the Young Top-notch Talent Training Project of Ningxia Hui Autonomous Region

*Corresponding author. Tel: +86-951-6882352; Fax: +86-951-6886917; E-mail: yuexiasha@126.com

Received: 29 October 2021; Revised: 7 December 2021; Published online: 13 December 2021

培养根瘤菌的丰度, 降低了黄色氢噬菌(*Hydrogenophaga flava*)的丰度; 对内生真菌种水平的影响包括降低了栖土光黑壳(*P. terricola*)、*Neocosmospora rubicola*、*Gibberella intricans*、帚状曲霉(*A. penicillioides*)及未分类镰刀菌的丰度。PICRUSt2 功能预测分析表明, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种增加了盐胁迫下水稻幼苗根系参与各种代谢通路的内生细菌丰度; FUNGuild 功能预测分析显示, 增加了动物病原真菌代谢相关的真菌丰度、菌根真菌丰度和内生真菌的丰度, 降低了粪便浮生菌、真菌浮生物和植物病原菌的丰度。【结论】假单胞菌浸种可以显著提高盐胁迫下水稻幼苗根系内生菌群落多样性、改变优势菌群结构和改善盐胁迫下水稻幼苗根系生长的微生态环境。

关键词: 假单胞菌; 浸种; 盐胁迫; 水稻根系内生菌; 群落多样性

Effects of soaking seeds with *Pseudomonas alcaliphila* Ej2 on endophytic community of rice roots under salt stress

SHA Yuexia^{*}

Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan 750011, Ningxia, China

Abstract: [Objective] To reveal the impact of soaking seeds with fermentation broth of *Pseudomonas alcaliphila* Ej2 on the diversity and structure of endophytic community in rice roots under salt stress. [Methods] The total DNA of the endophytic bacteria and fungi of the roots of Ningjing 61 was extracted, followed by high-throughput sequencing of the V5–V7 regions of the bacterial 16S rDNA gene and the ITS1–ITS2 of fungal ITS region. Thereby, the regulatory effects of soaking seeds with Ej2 on endophytic community of rice roots under salt stress were analyzed. [Results] Soaking seeds with Ej2 significantly improved the diversity, richness, and evenness of endophytic community of rice roots under salt stress. To be specific, it increased the number of phyla, classes, families, genera, and operational taxonomic units (OTUs, read number ≥ 5) of the endophytic community. In addition, for bacteria, it raised the relative abundance of *Bacteroidetes* (by 45.97%) and *Actinobacteria* (by 9.55%), and lowered the relative abundance of *Firmicutes* (by 12.22%). As to fungi, it significantly decreased relative abundance of *Ascomycota* (by 17.96%) and significantly elevated the relative abundance of *Mortierellomycota* and *Olpidiomyota*. Among them, *Olpidiomyota* was only detected after seed soaking with Ej2. After seeding soaking with Ej2, the relative abundance of *Pseudomonas*, *Allorhizobium*, *Flavobacterium*, and *Devosia* rose, and that of *Preussia*, *Schizothecium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Monosporascus* decreased. *Olpidium* was identified only after seed soaking with Ej2. As for the bacterial species, the relative abundance of *P. stutzeri*, *P. alcaliphila*, unclassified *Pseudomonas*, unclassified *Rhizobium*, and uncultured *Rhizobium* was up-regulated, and that of *Hydrogenophaga flava* was decreased after seeding soaking with Ej2. In terms of the fungal species the relative abundance of *P. terricola*, *Neocosmospora rubicola*, *Gibberella intricans*, *A. penicillioides* and unclassified *Fusarium* was reduced after seeding soaking with Ej2. PICRUSt2 prediction suggested that seeding soaking with Ej2 increased the abundance of bacterial community involved in various

metabolic pathways in rice roots under salt stress, and FUNGuild analysis indicated the increase in the abundance of fungi related to the metabolism of animal pathogenic fungi, mycorrhizal fungi, and endophytic fungi, and reduction in relative abundance of saprophytic fecal community, fungal saprophytes, and plant pathogens. **[Conclusion]** Soaking seeds with *Pseudomonas* can significantly increase the diversity of endophytic community of rice roots under salt stress, change the structure of dominant endophytic flora, and improve the microecological environment of rice roots.

Keywords: *Pseudomonas*; seed soaking; salt stress; endophytic community of rice root; community diversity

水稻(*Oryza sativa* L.)是重要的世界性粮食作物, 盐碱地是水稻种植的重要耕地资源, 盐胁迫严重影响了水稻的产量和品质^[1-2]。稻瘟病(rice blast)是主要病害, 平均每年减产20%–30%, 流行年份产量损失50%以上^[3]。抗病品种和化学农药是主要的防治措施, 但是抗病品种选育周期较长, 化学农药残留容易危害生态环境和人类健康^[4]。因此, 水稻稻瘟病的生物防治越来越受到关注。假单胞菌(*Pseudomonas*)属于细菌界的变形菌门(*Proteobacteria*) γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)假单胞菌目的假单胞菌科, 可以产生多种活性物质, 防病、促生和增产的效果显著, 能增强植株的抗病性^[5-6]和抗逆性^[7], 是具有较大应用潜力的微生物。前期研究表明, 假单胞菌对稻瘟病的防效明显, 可用于盐碱地水稻稻瘟病的生物防治^[6]。

植物内生菌具有重要的生态功能, 包括增强植株抗病虫害等生物胁迫^[8]、提高抵抗盐碱等非生物胁迫的能力^[9]、促生增产效果明显^[10-11]、协助寄主吸收环境中的营养物质^[12-13]、降解农药残留及重金属污染等。植物内生菌群落是植物微生态系统的重要组成部分^[14-15], 土壤营养条件^[16-17]、土壤pH值、品种基因型^[18-19]、植株抗性^[20-21]、药剂和肥料、农业措施等都会影响内生菌群落结构和多样性^[22]。West等^[23]发现葡萄抗病品种和感病品种的内生细菌群落

结构和多样性差异显著。已有研究表明, 施用药剂会影响水稻组织内生菌群落多样性^[24]。崔凯等^[25-26]发现, 喷施吡虫啉、噻虫嗪和苯醚甲环唑等化学农药后会导致水稻根系组织内生细菌群落的丰富度下降, 噻虫嗪可以提高根系内生真菌群落的多样性。本课题组^[27]研究表明, 芽胞杆菌(*Bacillus*)浸种后显著增加水稻根、茎和叶片组织内生细菌群落多样性、均匀度和丰富度。目前针对盐胁迫下的植株内生菌群落多样性的研究较多, 包括盐生植物内生菌多样性以及潜在功能研究等^[28], 但是生防菌对盐胁迫下水稻组织内生菌群落多样性及结构影响的研究未见报道。

嗜碱假单胞菌(*P. alcaliphila*) Ej2是本实验室从宁夏水稻叶片中分离获得, 室内分析及田间试验表明对稻瘟病菌有明显防治效果; 前期试验证实其对不同浓度盐溶液胁迫下的水稻幼苗根系活力、根长、根数及生长具有促进效果, 特别是对0.20% NaCl溶液胁迫下的促进效果非常显著, 可以在生理层面上提高水稻幼苗根系的耐盐性(待发表)。本研究采用高通量测序技术开展假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生菌群落多样性及结构影响的研究。一方面明确假单胞菌浸种处理对水稻根部内生真菌与内生细菌的群落多样性及结构、优势菌群、共有物种的影响; 另一方面剖析假单胞菌浸种后对水稻幼苗根系内生菌群落与耐盐性之间的关

系,从而揭示假单胞菌浸种处理对水稻幼苗根系抗逆性的影响。本文旨在为假单胞菌杀菌剂在盐碱地水稻产业高质量发展中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 水稻种植

试验于 2021 年 7 月–9 月在宁夏农林科学院植物保护研究所日光温室进行(38°47'N, 106°27'E, 海拔高度 1 080 m)。种植土壤为自然土:营养土=3:1, 自然土类型为灌淤土, 有机质含量约 0.57%, 氮含量约 0.05%, 速效磷含量约 5.50 mg/kg。然后 1 kg 种植土壤中加入 3 g NaCl, pH 8.5–8.8。

挑选饱满、无病斑、大小一致的水稻宁粳 61 号种子, 每个培养皿选择 100 粒。所有种子在 1%次氯酸钠溶液中浸泡 30 min, 采用无菌水冲洗 3–5 次, 吸水纸吸干种子表面水分。然后分别采用嗜碱假单胞菌 Ej2 发酵液[(1.0–1.2)×10⁸ CFU/mL]和无菌水浸种 6 h, 再将 2 组种子表面水分吸干后浸泡在 5 mL 0.20% NaCl 溶液中于 28 °C 培养箱内催芽 48 h。采用营养钵种植催芽后的水稻种子(10 粒/营养钵), 营养钵放入塑料盘内(6 个/盘)。每个营养钵底部有 8 个小孔以保证充分吸收盐溶液, 采用 0.20% NaCl 溶液代替水灌溉。每隔 3 d 更换 1 次 NaCl 溶液, 每次清洗干净塑料盘以保证 NaCl 溶液浓度不变。

1.2 样本采集

水稻种植约 25 d (幼苗期)采集样本, 将水稻连同根系轻轻拨出, 用流动水持续冲洗根系, 直至肉眼可见异物完全冲洗干净。将完整根系组织剪下, 用 75%酒精浸泡 3 min, 重复 3 次, 然后用无菌水反复冲洗, 采用最后一次冲洗液在固体 NA 培养基上涂板, 无菌落长出视为根

系表面无菌^[27]。严格表面消毒的样本先在液氮中冷冻, 然后保存在–80 °C 冰箱中备用。试验设计 2 组处理: CK 为空白对照(无菌水浸种); Ej2 为嗜碱假单胞菌 Ej2 发酵液浸种, 每组处理 3 个重复, 每个重复 6 个塑料盘(种植约 360 株水稻)。水稻幼苗根系内生细菌群落多样性测试共有 6 组样本: 空白对照 BCK (CK-1、CK-2、CK-3); 嗜碱假单胞菌 BEj2 (Ej2-1、Ej2-2、Ej2-3)。水稻幼苗根系内生真菌群落多样性测试共有 6 组样本: 空白对照 FCK (CK-1、CK-2、CK-3); 嗜碱假单胞菌 FEj2 (Ej2-1、Ej2-2、Ej2-3)。

1.3 抽提水稻幼苗根系内生菌的基因组 DNA

根据 FastDNA™ SPIN kit (MP Biomedicals) 说明书提取所有表面无菌样本的基因组总 DNA^[29], DNA 的提取质量采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, DNA 的浓度和纯度采用 NanoDrop2000 测定。

1.4 16S rRNA 基因测序

水稻幼苗根系内生细菌的 PCR (polymerase chain reaction)扩增引物为 799F: 5'-barcode-AACMGGATTAGTAGATACCKG-3', 1193R: 5'-ACGTCATCCCCACCTTCC-3', 针对 16S rRNA 基因 V5–V7 高变区进行扩增^[27], 特异性引物需要包含 barcode, 由上海美吉生物医药科技有限公司合成。PCR 反应体系: 5×TransStart FastPfu Buffer 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 正向和反向引物(5 μmol/L)各 0.8 μL, TransStart FastPfu DNA Polymerase 0.4 μL, Template DNA 10 ng, ddH₂O 补至 20 μL。PCR 扩增程序: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 27 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存(PCR 仪是 ABI GeneAmp® 9700 型)。使用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega 公司)对第二轮 PCR 扩增产物进行检测定量,

之后根据测序量要求进行一定比例的混合, 利用 Illumina 公司的 MiSeq PE250 平台测序。

水稻幼苗根系内生真菌扩增引物为 ITS1F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3', ITS2R: 5'-CTCGGACGAGGATCCTCGCC-3', 针对 ITS 基因的 ITS1-ITS2 区进行扩增^[26,30]。PCR 反应体系: 5×TransStart FastPfu Buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL, 10 μmol/L 引物 ITS1F 和 ITS2R 各 2 μL, 5 U/μL rTaq 酶 0.5 μL, Template DNA 2 μL, ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 扩增程序: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 54 °C 30 s, 72 °C 90 s, 32 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 直至结束。以上 PCR 产物由上海美吉生物医药科技有限公司完成测序。

1.5 数据处理与分析

数据采用 Excel 2016 和 DPS18.1 软件完成统计分析, 单因素试验统计分析中的最小显著差数法(least significant ranges, LSD) ($P<0.05$) 表示方差分析, 数据为平均值±标准误(SE)。处理率按照公式(1)计算。

增加率(%)=

$[(Ej2 \text{ 处理组}-CK \text{ 组})/CK \text{ 组}] \times 100$ 公式(1)

MiSeq 测序获得的原始数据根据 overlap 关系拼接序列, 通过质控过滤检测 reads 质量和 merge 效果, 优化数据得到有效序列; 提取有效序列中的非重复序列, 降低冗余计算量, 进一步去除单序列; 所有样本的序列通过聚类分析, 序列相似的划分为一个小组, 称之为分类单元(operational taxonomic units, OTU), 对相似性达到 97%非重复序列进行 OTU 聚类分析, 去除嵌合体后获得代表 OTU 序列; 针对 97%相似性 OTU 代表序列通过 RDP classifier 贝叶斯算法进行各物种的分类统计。利用上海美吉生物医药科技有限公司提供的生物云数据分析平台进行多样性在线分析: 用 Chao 指数

分析内生菌群落的丰富度, Shannon 多样性指数(指数越高, 多样性越高)及 Shannoneven 均匀度指数(指数越高, 均匀度越高)分析水稻幼苗根系内生菌群落的多样性^[27,31]; Coverage 覆盖度指数, 数值越高越能真实反映检测样本序列。同时基于 I-sanger 云数据分析平台构建物种群落丰度柱状图及 OTU 水平物种组成 Venn 图, 分析内生菌门、纲、属分类水平的优势菌群组成; 进行 PICRUST2 基因功能预测和 FUNGuild 功能预测, 分别进行内生细菌群落的功能分类及丰度信息统计。

2 结果与分析

2.1 假单胞菌浸种后水稻幼苗根系内生菌序列统计和多样性

2.1.1 内生细菌序列统计和多样性

采用 Flash 软件, 原始序列数据通过拼接、质控过滤和聚类分析去除嵌合体, 从而获得优化序列用于进一步分析。2 组处理 6 个水稻幼苗根系样本共获得 667 275 个有效序列, 优化序列碱基数目为 253 331 601 bp, 每个样本平均包含 111 213 个序列, 序列平均长度为 379 bp。一般情况下, 对相似水平在 97%的 OTU 数量和多样性指数进行生物信息学统计分析, 6 个样本共获得 1 428 个 OTU。空白对照的 OTU 范围是 573–788 个, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种的 OTU 范围是 714–856 个。假单胞菌浸种后增加了盐胁迫下的水稻根部内生细菌的 OTU 数量。

Alpha 多样性可以评估微生物群落的物种丰富度、多样性、均匀度和覆盖度等指标。本研究通过 Alpha 多样性数据剖析假单胞菌浸种处理对盐胁迫下水稻根系内生细菌群落多样性、丰富度、均匀度的影响, 结果见表 1。嗜

表 1 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生细菌群落多样性的影响

Table 1 Impact of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic bacterial community diversity of rice seedling root under salt stress

Samples	Shannon index	Chao index	Coverage/%	Shannoneven index	Sequences number	OTU number
BCK	3.75±0.23 b	716.44±56.03 b	100	0.56±0.03 b	80 497±24 508.36 a	665±63.97 a
BEj2	3.88±0.06 a	842.23±35.85 a	100	0.60±0.01 a	141 928±5 736.35 a	803±44.77 a

BCK means empty control group; BEj2 means *Pseudomonas* control group; OTU: the similar effective sequence more than 97% sequence is grouped into unit; values are means±standard error ($n=3$). Different letters indicate significant differences using LSD' test at $P\leq 0.05$.

碱假单胞菌 Ej2 浸种处理显著增加了盐胁迫下水稻幼苗根系内生细菌群落的多样性、丰富度和均匀度 ($P<0.05$), 增加率分别为 3.47%、17.57%和 7.14%。

Beta 多样性主要用于比较微生物群落间的差异, 主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)是最常见的评估方法。通过 PCoA 分析, 发现不同处理之间多样性差异较明显(图 1)。PCoA 的前 2 个主成分轴解释了 82.07%的群落差异, 其中轴 I 和轴 II 分别是 59.05%和 23.02%。CK 和 Ej2 处理的内生细菌群落明显分开。Beta 分析结果说明嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理对盐胁迫下的水稻根系内生细菌群落影响较大。由于 $P=0.098$, 说明本次内生细菌群落多样性的检测可信度较低, 可能是 DNA 提取采用的是土壤、根、茎通用试剂盒有关, 有必要采用植物内生菌 DNA 提取试剂盒进行验证。

2.1.2 内生真菌序列统计和多样性

水稻幼苗根系内生真菌检测样本共获得 844 120 个有效序列, 优化序列碱基数目为 196 004 538 bp, 每个样本平均含有 140 687 个序列, 序列平均长度为 232 bp。6 个样本共获得 393 个 OTU。空白对照的 OTU 范围是 36–65 个, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理后的 OTU 范围是 53–125 个。嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后增加了盐胁迫下的水稻根部内生真菌的 OTU 数量。

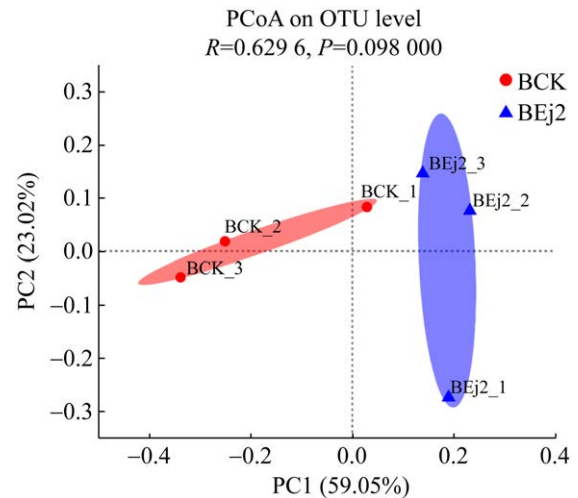


图 1 假单胞菌浸种后水稻幼苗根系内生细菌群落的主坐标分析(OTU 水平)

Figure 1 Principal co-ordinates analysis (PCoA) of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic bacterial community of rice seedling root (OTU level). "PCoA on OTU level" means principal co-ordinates analysis on OTU level, PC1 represent first principal component, and PC2 represent second principal component. BCK means empty control group; BEj2 means *Pseudomonas* control group.

Alpha 多样性分析证实, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理对盐胁迫下水稻根系内生真菌群落多样性、丰富度、均匀度的影响显著, 结果见表 2。嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理增加了盐胁迫下水稻幼苗根系内生真菌群落的多样性、丰富度和均匀度 ($P<0.05$), 增加率分别为 16.00%、53.20%和 6.00%。

表 2 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生真菌群落多样性的影响

Table 2 Impact of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic fungal community diversity of rice seedling root under salt stress

Samples	Shannon index	Chao index	Coverage/%	Shannoneven index	Number of sequences	OTU number
FCK	2.00±0.29 b	52.33±8.37 b	100	0.50±0.05 b	153 645±9 329.16 a	51±8.41 a
FEj2	2.32±0.58 a	80.17±22.55 a	100	0.53±0.10 a	127 728±30 179.43 a	80±9.78 a

FCK means empty control group; FEj2 means *Pseudomonas* control group; OTU: the similar effective sequence more than 97% sequence is grouped into unit; values are means±standard error ($n=3$); different letters indicate significant differences using LSD' test at $P\leq 0.05$.

Beta 多样性采用 R 语言(version 3.3.1)基于所选距离矩阵作图进行 PCoA 分析, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种和空白对照的内生真菌群落多样性差异比较明显(图 2)。PCoA 的前 2 个主成分轴解释了 72.23% 的群落差异, 其中轴 I 和轴 II 分别是 37.39% 和 34.84%。CK 和 Ej2 处理的内

生真菌群落明显分开。Beta 分析结果说明, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理对盐胁迫下的水稻根系内生真菌群落影响较大。 P 值说明内生真菌检测的可信度较低, 有必要进一步验证。

2.2 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻根系内生菌群落结构的影响

2.2.1 对内生菌 OTU 的影响

采用单因素试验统计分析中的最小显著差数法(LSD)法计算不同处理之间的门、纲、目、科、属和 OTU 方差分析, 结果表明嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理对盐胁迫下水稻宁粳 61 号根部组织内生细菌群落的影响较大, 显著增加了门、纲、属和 OTU (序列数 ≥ 5)的数量($P<0.05$), 对目、种和科的数量影响不显著($P>0.05$)。空白对照组根部内生细菌群落属于 18–22 个门, 30–42 个纲, 79–106 个目, 134–184 个科, 231–309 个属, 573–788 个 OTU。嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理后的内生细菌群落至少属于 23–28 个门, 40–46 个纲, 95–125 个目, 160–194 个科, 261–317 个属, 714–856 个 OTU。

嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理增加了水稻宁粳 61 号幼苗根系内生真菌群落的门、纲、属、种和 OUT (序列数 ≥ 5)的数量($P<0.05$), 对目和科的数量影响不显著($P>0.05$)。空白对照组根部内生真菌群落属于 4–5 个门, 9–10 个纲, 13–20 个目, 19–27 个科, 24–34 个属,

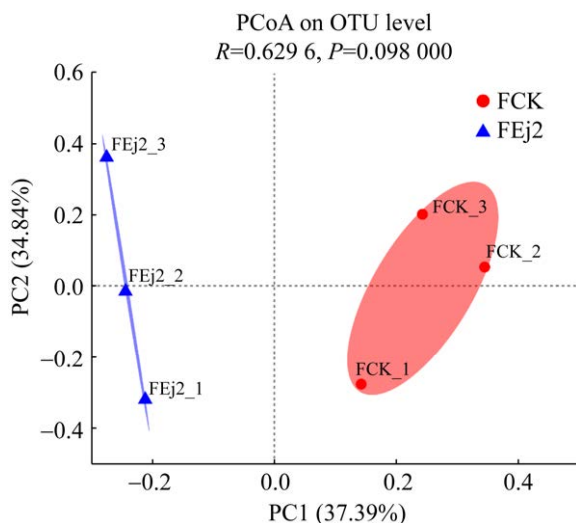


图 2 假单胞菌浸种后水稻幼苗根系内生真菌群落的主坐标分析(OTU 水平)

Figure 2 Principal co-ordinates analysis (PCoA) of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic fungal community of rice seedling root (OTU level). "PCoA on OTU level" means Principal co-ordinates analysis on OTU level, PC1 represent first principal component, and PC2 represent second principal component. FCK means empty control group; FEj2 means *Pseudomonas* control group.

36–65 个 OTU。嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理后的水稻幼苗根系内生真菌群落至少属于 7–8 个门, 12–15 个纲, 19–31 个目, 25–43 个科, 36–59 个属, 53–125 个 OTU。

2.2.2 对门水平丰度的影响

水稻幼苗根部内生细菌中相对丰度 $\geq 1\%$ 的门有 4 个, 主要包括变形菌门、放线菌门 (*Actinobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) (图 3)。嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理对水稻根部内生细菌的变形菌门丰度影响不显著 ($P>0.05$), CK ($90.07\%\pm 0.01\%$) $>$ Ej2 ($87.80\%\pm 3.01\%$); 增加了拟杆菌门的丰度, Ej2 ($8.51\%\pm 0.74\%$) $>$ CK ($5.83\%\pm 2.22\%$); 降低厚壁菌门的丰度, CK ($1.01\%\pm 0.25\%$) $>$ Ej2 ($0.90\%\pm 0.33\%$); 增加放线菌门的丰度, Ej2 ($1.95\%\pm 0.28\%$) $>$ CK ($1.78\%\pm 0.42\%$)。

图 4 显示, 空白对照的水稻幼苗根部内生真菌中相对丰度 $\geq 1\%$ 的门只有 2 个, 主要是子囊菌门 (*Ascomycota*) 和担子菌门 (*Basidiomycota*); 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理组有 4 个内生真菌

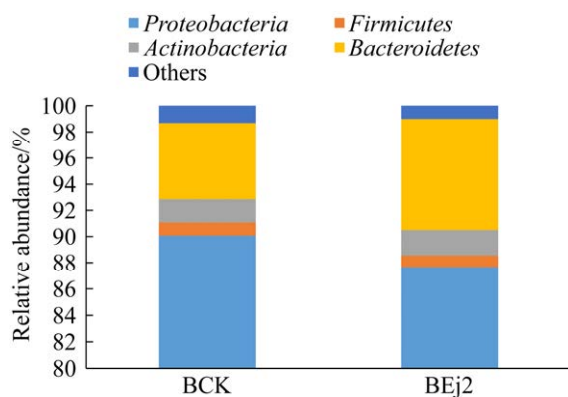


图 3 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生细菌菌群组成的影响(门水平)

Figure 3 Impact of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic bacterial community structure of rice seedling root under salt stress (phylum level). BCK means empty control group; BEj2 means *Pseudomonas* control group.

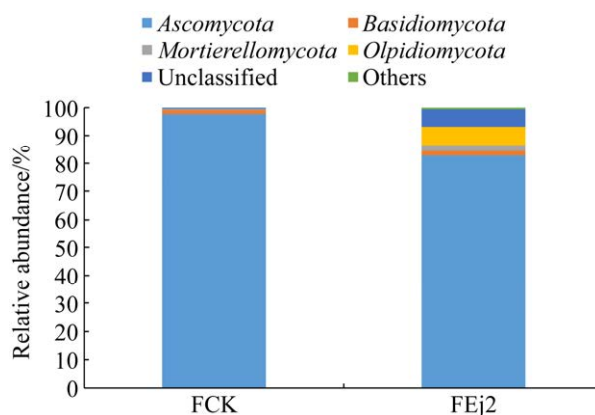


图 4 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生真菌菌群组成的影响(门水平)

Figure 4 Impact of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic fungal community structure of rice seedling root under salt stress (phylum level). FCK means empty control group; FEj2 means *Pseudomonas* control group.

门的相对丰度 $\geq 1\%$, 主要包括子囊菌门、担子菌门、被孢霉门 (*Mortierellomycota*) 和油壶菌门 (*Olpidiomyces*), 油壶菌门是假单胞菌 Ej2 浸种后的独有真菌门。假单胞菌浸种处理对水稻根部内生真菌的担子菌门丰度影响不显著 ($P>0.05$), Ej2 ($1.67\%\pm 0.78\%$) $>$ CK ($1.47\%\pm 0.42\%$); 显著增加被孢霉门丰度 ($P<0.05$), Ej2 ($2.08\%\pm 0.28\%$) $>$ CK ($0.41\%\pm 1.31\%$); 显著降低子囊菌门的丰度 ($P<0.05$), CK ($97.72\%\pm 0.61\%$) $>$ Ej2 ($82.84\%\pm 3.39\%$); 显著增加油壶菌门的丰度 ($P<0.05$), Ej2 ($6.57\%\pm 5.67\%$) $>$ CK (0%)。

2.2.3 对纲水平丰度的影响

嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理后水稻根系内生细菌中 4 个纲的相对丰度 $\geq 1\%$ (图 5)。假单胞菌浸种处理显著降低了根部组织中 γ -变形菌纲和放线菌纲 (*Actinobacteria*) 的相对丰度 ($P<0.05$), 丰度变化分别为 CK ($55.01\%\pm 0.84\%$) $>$ Ej2 ($31.94\%\pm 3.94\%$) 和 CK ($1.61\%\pm 0.26\%$) $>$ Ej2 ($1.48\%\pm 0.37\%$); 增加了 α -变形菌纲 (*Alphaproteobacteria*) 和拟杆菌纲 (*Bacteroidia*)

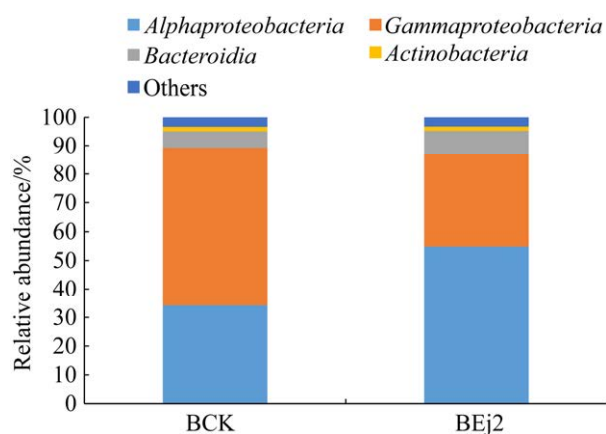


图 5 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生细菌菌群组成的影响(纲水平)

Figure 5 Impact of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic bacterial community structure of rice seedling root under salt stress (class level). BCK means empty control group; BEj2 means *Pseudomonas* control group.

的相对丰度, 丰度变化分别为 Ej2 ($54.85\% \pm 4.15\%$) > CK ($34.26\% \pm 1.41\%$) 和 Ej2 ($8.44\% \pm 0.73\%$) > CK ($5.78\% \pm 2.21\%$)。其中 γ -变形菌纲 ($25.54\% - 56.52\%$) 和 α -变形菌纲 ($30.84\% - 59.71\%$) 隶属于变形菌门, 放线菌纲 ($0.92\% - 2.17\%$) 属于放线菌门, 拟杆菌纲 ($4.24\% - 11.67\%$) 属于拟杆菌门。

图 6 显示, 空白对照组根系内生真菌中相对丰度 $\geq 1\%$ 的纲有 5 个, 主要包括子囊菌纲 (*Sordariomycetes*)、座囊菌纲 (*Dothideomycetes*)、锤舌菌纲 (*Leotiomycetes*)、散囊菌纲 (*Eurotiomycetes*) 和银耳纲 (*Tremellomycetes*); 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后有 7 个纲相对丰度 $\geq 1\%$, 除了与空白对照组相同纲之外, 还包括油壶菌纲 (*Olpidiomyces*) 和被孢霉纲 (*Mortierellomycetes*), 其中油壶菌纲是独有的优势菌纲。结果表明, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种显著增加子囊菌纲、锤舌菌纲、银耳纲、油壶菌纲和被孢霉纲的丰度, 显著降低座囊菌纲丰度, 对散囊菌纲丰度

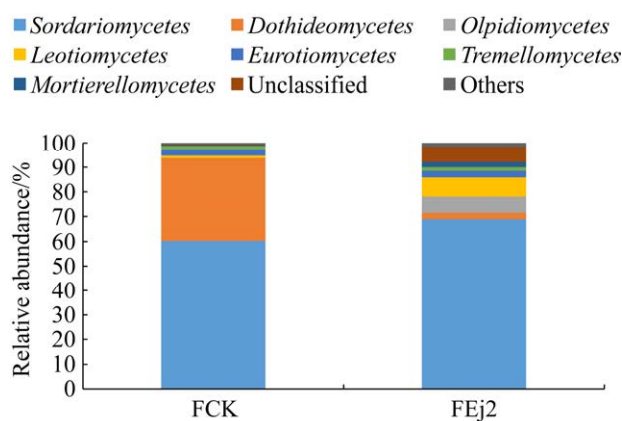


图 6 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生真菌菌群组成的影响(纲水平)

Figure 6 Impact of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic fungal community structure of rice seedling root under salt stress (class level). FCK means empty control group; FEj2 means *Pseudomonas* control group.

没有显著影响 ($P > 0.05$)。子囊菌纲 ($38.21\% - 79.86\%$)、锤舌菌纲 ($0.69\% - 4.23\%$)、散囊菌纲 ($0.01\% - 4.97\%$) 和座囊菌纲 ($0.64\% - 49.16\%$) 属于子囊菌门, 银耳纲 ($0.56\% - 1.92\%$) 属于担子菌门, 油壶菌纲 ($0.25\% - 17.38\%$) 属于油壶菌门。

2.2.4 对属水平丰度的影响

嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后盐胁迫下水稻幼苗根系相对丰度 $\geq 2\%$ 的细菌属有 6 个, 相对丰度 $\geq 5\%$ 视为优势菌属, 有 22.43% 以上的细菌属不能分类 (图 7)。清水对照根部内生细菌优势菌属是假单胞菌属、根瘤菌属 (*Allorhizobium*) 和氢噬菌属 (*Hydrogenophaga*), 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后的优势菌属是假单胞菌属、根瘤菌属和黄杆菌属 (*Flavobacterium*)。试验结果证实, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种显著降低了盐胁迫下的水稻幼苗根系组织中氢噬菌属和志贺氏菌属 (*Shinellia*) 的相对丰度, 降低率分别为 $58.69\% \pm 0.99\%$ 和 $1.79\% \pm 0.35\%$; 增加了假单胞菌属、根瘤菌属、黄杆菌属和德沃斯氏菌属

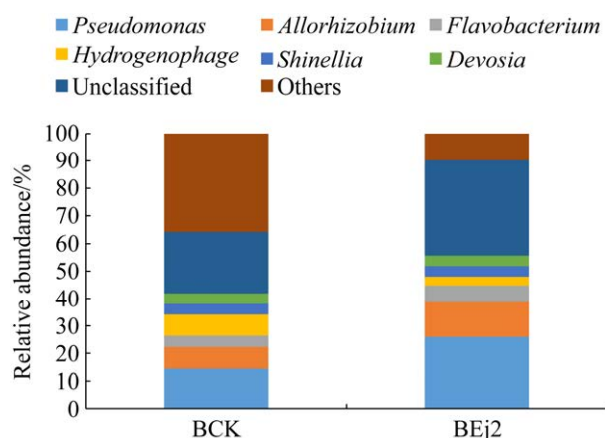


图 7 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生细菌菌群组成的影响(属水平)

Figure 7 Impact of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic bacterial community structure of rice seedling root under salt stress (genus level). BCK means empty control group; BEj2 means *Pseudomonas* control group.

(*Devosia*) 的相对丰度, 增加率分别是 $80.03\% \pm 2.68\%$ 、 $61.93\% \pm 1.83\%$ 、 $47.45\% \pm 1.19\%$ 和 $1.59\% \pm 0.59\%$ 。

在盐胁迫下, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种对水稻幼苗根系内生真菌属水平丰度的影响显著(图 8), 空白对照 5 个属的相对丰度 $\geq 2\%$, 其中相对丰度 $\geq 5\%$ 的优势菌属主要包含新赤壳

属(*Neocosmospora*)、光黑壳属(*Preussia*)和裂壳属(*Schizothecium*), 约 14.18% 的真菌属不能分类; 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后的内生真菌中相对丰度 $\geq 2\%$ 的属有 7 个, 新赤壳属、柄孢壳菌属(*Podospora*)、赤霉属(*Gibberella*)和油壶菌属(*Olpidium*)的丰度 $\geq 5\%$, 14.47% 的真菌属不能分类。试验结果证实, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种显著降低了盐胁迫下的水稻幼苗根系组织中光黑壳属、裂壳属、镰孢菌(*Fusarium*)、曲霉属(*Aspergillus*)和 *Monosporascus* 的相对丰度, 降低率分别为 100%、 $89.83\% \pm 0.57\%$ 、 $17.81\% \pm 1.02\%$ 、 $71.17\% \pm 0.42\%$ 和 $92.62\% \pm 1.32\%$; 显著增加了新赤壳属、柄孢壳菌属、赤霉属、假裸囊菌属(*Pseudogymnoascus*)、被孢霉属(*Mortierella*)、假散囊菌属(*Pseudeurotium*)、枝孢属(*Cladosporium*)、油壶菌属(*Olpidium*)和 *Leuconuerspora* 的相对丰度。光黑壳属是空白对照组独有的真菌属, 油壶菌属是嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理后的独有真菌属。

2.2.5 对种水平丰度的影响

嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生细菌的种水平丰度产生了影响。图 9 显示, 假单胞菌浸种处理后增加了盐胁迫下水

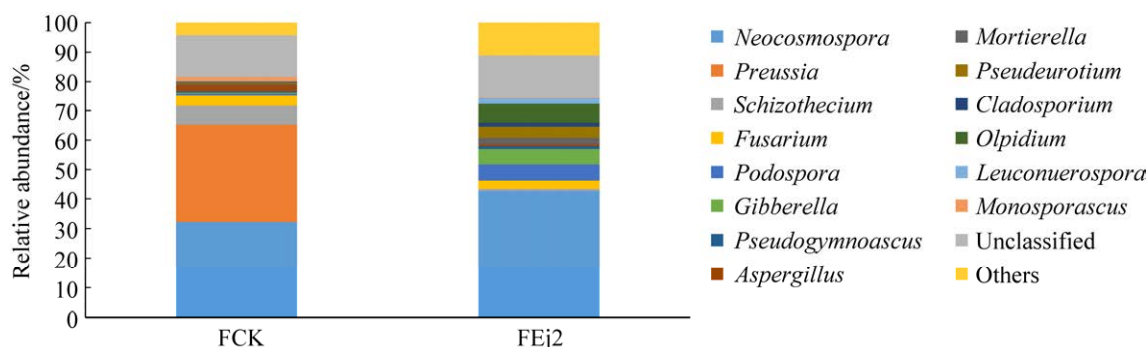


图 8 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生真菌菌群组成的影响(属水平)

Figure 8 Impact of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic fungal community structure of rice seedling root under salt stress (genus level). FCK means empty control group; FEj2 means *Pseudomonas* control group.

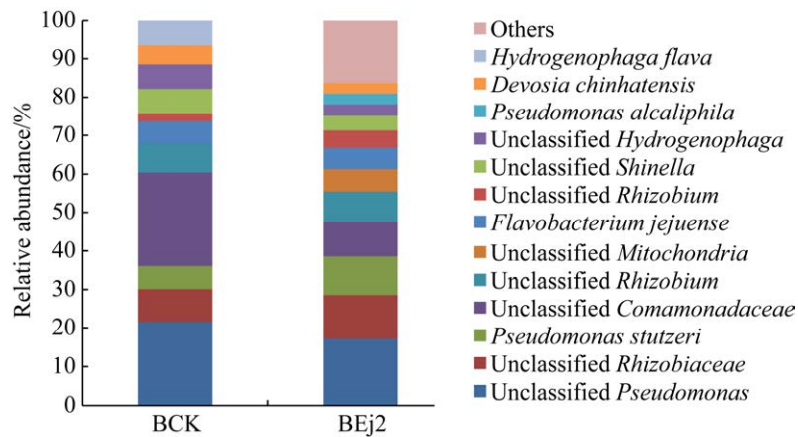


图 9 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生细菌菌群组成的影响(种水平)

Figure 9 Impact of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic bacterial community structure of rice seedling root under salt stress (species level). BCK means empty control group; BEj2 means *Pseudomonas* control group.

稻幼苗根系中的施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)、*F. jejuense*、嗜碱假单胞菌、未分类假单胞菌及根瘤菌、不能培养的根瘤菌丰度，而空白对照中未检测到嗜碱假单胞菌，说明菌株 Ej2 浸种后可以在盐胁迫下的水稻幼苗根系中定殖。黄色氢噬菌(*H. flava*)只在空白对照中检测到，

嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理后的根系中未检测到该菌。

盐胁迫条件下，嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种可以影响水稻幼苗根系内生真菌种水平的丰度。图 10 显示，嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后盐胁迫下的水稻幼苗根系中的假散囊菌(*Pseudeurotium*

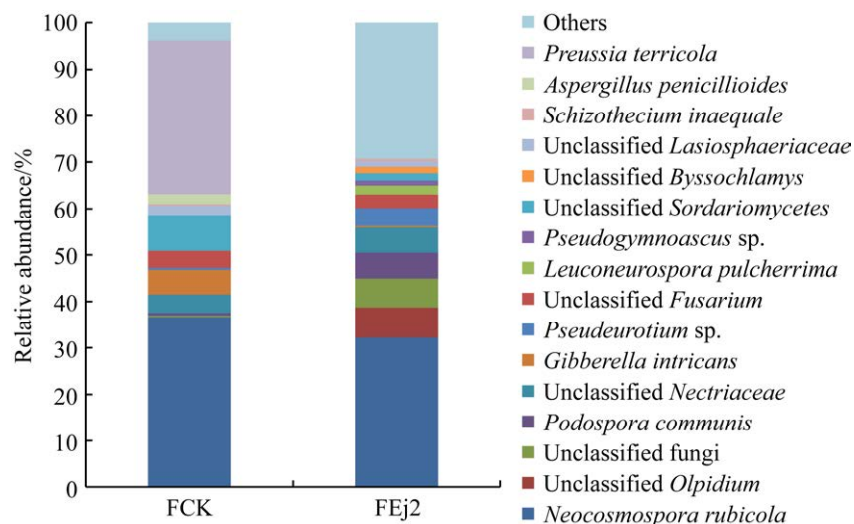


图 10 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生真菌菌群组成的影响(种水平)

Figure 10 Impact of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic fungal community structure of rice seedling root under salt stress (species level). FCK means empty control group; FEj2 means *Pseudomonas* control group.

sp.)、假裸囊菌、*Podospora communis*、*Leuconurospora pulcherrima* 丰度均高于空白对照, 降低了栖土光黑壳(*P. terricola*)、*Neocosmospora rubicola*、*Gibberella intricans*、帚状曲霉(*A. penicillioides*)及未分类镰刀菌的丰度。

2.3 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生菌共有和独有物种的影响

Venn 图可以用于比较样本中共有和独有的 OTU 数量情况, 柱形图显示了各处理的总物种数量。图 11 显示嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理后显著影响盐胁迫下的水稻根部内生细菌群落中的 OTU 数量($P<0.05$), 空白对照的总物种 OTU 数量是 990 个, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后的总物种 OTU 数量是 1 208 个。浸种处理与空白对照之间既有共有 OTU, 又有独有 OTU。不同处理的根部内生细菌共有 OTU 物种是 770 个,

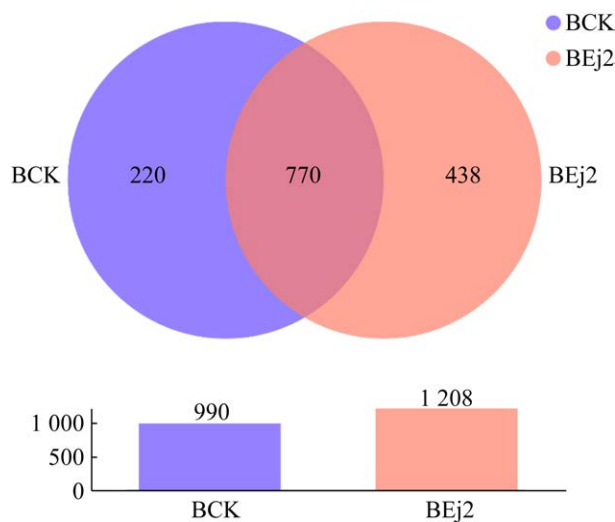


图 11 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生细菌 OTU 的影响(Venn 分析)

Figure 11 Impact of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic bacterial community OTU of rice seedling root under salt stress (Venn analysis). BCK means empty control group; BEj2 means *Pseudomonas* control group.

空白对照独有 OTU 数量是 220 个, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后的独有 OTU 数量是 438 个。

图 12 显示, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理对盐胁迫下的水稻根部内生真菌群落中的 OTU 数量影响显著($P<0.05$), 空白对照的总物种 OTU 数量是 100 个, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后的总物种 OTU 数量是 166 个。浸种处理与空白对照之间既有共有 OTU, 又有独有 OTU。2 组处理的水稻幼苗根系内生真菌共有 OTU 物种是 64 个, 空白对照的独有 OTU 数量是 36 个, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后的独有 OTU 数量是 102 个。

2.4 假单胞菌浸种对盐胁迫下的水稻根系内生菌群落的功能预测分析

通过 PICRUST2 功能预测, 利用 KEGG 数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)中细菌基因组信息和功能信息, 对水稻幼苗根

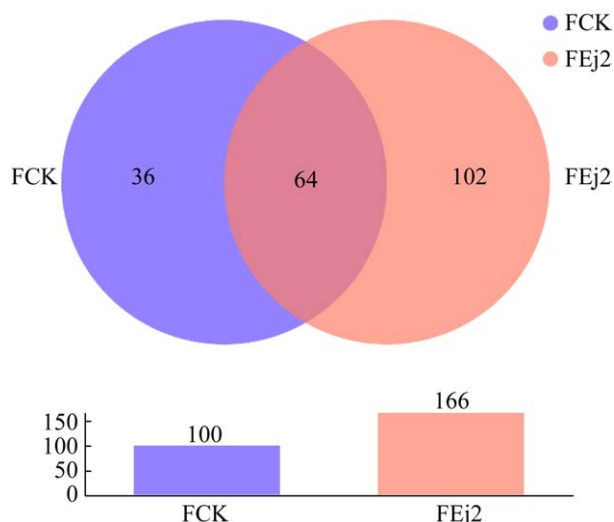


图 12 假单胞菌浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系内生真菌 OTU 的影响(Venn 分析)

Figure 12 Impact of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic fungal community OTU of rice seedling root under salt stress (Venn analysis). FCK means empty control group; FEj2 means *Pseudomonas* control group.

系内生细菌群落参与 KEGG pathway 丰度进行统计。表 3 结果表明, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系参与 KEGG 代谢通路的内生细菌丰度影响较大; 根系内生细菌群落主要参与细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、各种代谢通路和有机系统等 6 个一级代谢通路, 假单胞菌浸种处理增加了参与这 6 个代谢通路的内生细菌丰度, 增加率分别为 68.17%、74.09%、81.13%、130%、75.21%和 71.95%。

通过 FUNGuild (fungi functional guild)功能预测, 对内生真菌群落的物种信息进行注释。表 4 结果表明, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后对盐胁迫下水稻幼苗根系内生真菌中病原菌、共生菌和腐生菌的丰度影响较大; 增加了根系中相关动物病原菌的真菌丰度、菌根真菌丰度和内生真菌丰度, 降低了根系组织中动物粪便腐生菌丰度、真菌腐生菌丰度以及植物病原菌的丰度。

表 3 假单胞菌浸种后盐胁迫下水稻幼苗根系内生细菌群落的 KEGG 代谢通路丰度

Table 3 KEGG metabolic pathway abundance of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic bacterial community in rice seedling root under salt stress

Pathway level1	BCK	BEj2
Cellular processes	10 328 018.47	17 369 060.21
Environmental information processing	14 074 619.03	24 502 143.70
Genetic information processing	8 945 686.76	16 203 000.08
Human diseases	8 687 412.44	15 221 439.39
Metabolism	128 481 867.33	223 937 666.19
Organismal systems	3 458 640.07	5 947 227.12

BCK means empty control group; BEj2 means *Pseudomonas* control group.

3 讨论与结论

水稻植株内生菌群落多样性是评价水稻植株健康生长的重要指标之一^[30]。本研究采用微生物多样性测序技术检测嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种对盐胁迫下水稻幼苗根系组织内生菌群落多样性的影响, 研究结果表明, 在盐胁迫下嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后水稻幼苗根系内生真菌和内生细菌群落的多样性、丰富度和均匀度均显著提高, 证实嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后能增强盐胁迫下水稻幼苗根系生长内环境的稳定性, 进而提高根系的抗逆性。

土壤 pH 值、栽培措施、土壤营养状况、喷施药剂、品种抗性及其基因型等因素会影响植物内生菌群落多样性^[26-27]。崔凯等^[25-26]研究发现, 化学农药(吡虫啉、噻虫嗪和苯醚甲环唑)降低了水稻根系内生细菌群落丰富度, 高浓度的毒死蜱会降低根系内生细菌群落多样性, 噻虫嗪对根系内生真菌群落多样性影响显著。已有研究说明, 化学农药与生防菌剂对水稻根系组织内生菌群落多样性的影响显著不同, 进而验证了栽培措施、药剂喷施或浸种、品种特性等因素会影响水稻组织内生菌群落多样性^[25-27]。本研究采用嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种宁粳 61 号后, 盐胁迫下的水稻幼苗根系内生真菌和内生细菌群落多样性发生显著变化。分析原因, 一方面嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后可能促进了水稻幼苗根系中部分内生真菌和细菌的生长; 另一方面也会抑制一些有害真菌和细菌的生长。因此, 导致水稻幼苗根系中内生真菌和内生细菌群落多样性发生显著变化。

水稻根系内生细菌主要包括变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门, 药剂喷施或浸种显著影响门水平的丰度。芽胞杆菌浸种显著增加了拟杆菌门丰度、降低厚壁菌门丰度、对

表 4 假单胞菌浸种后盐胁迫下水稻幼苗根系内生真菌群落的功能

Table 4 Fungi functional guild of seed soaked by *Pseudomonas* on endophytic fungal community in rice seedling root under salt stress

Classification	Guild	FCK	FEj2
Animal	Animal endosymbiont-animal pathogen-endophyte-plant pathogen-undefined saprotroph	0	104
	Animal endosymbiont-undefined saprotroph	36	347
	Animal parasite-fungal parasite	0	8 372
	Animal pathogen	185	553
	Animal pathogen-dung saprotroph-endophyte-epiphyte-plant saprotroph-wood saprotroph	342	334
	Animal pathogen-dung saprotroph-endophyte-lichen parasite-plant pathogen-undefined saprotroph	215	353
	Animal pathogen-endophyte-lichen parasite-plant pathogen-soil saprotroph-wood saprotroph	5 588	3 830
	Animal pathogen-endophyte-lichen parasite-plant pathogen-wood saprotroph	387	1 603
	Animal pathogen-endophyte-plant pathogen-wood saprotroph	0	833
	Animal pathogen-plant pathogen-undefined saprotroph	14	0
	Animal pathogen-soil saprotroph	155	1 393
	Animal pathogen-undefined saprotroph	60	113
Dung	Dung saprotroph	11 362	1 173
saprotroph	Dung saprotroph-endophyte-litter saprotroph-undefined saprotroph	7 029	878
	Dung saprotroph-plant saprotroph	50 591	0
Mycorrhizal	Ectomycorrhizal	0	245
	Ectomycorrhizal-endophyte-ericoid mycorrhizal-litter saprotroph-orchid mycorrhizal	66	11
	Ericoid mycorrhizal	0	293
Endophyte	Endophyte	0	69
	Endophyte-lichen parasite-undefined saprotroph	0	225
	Endophyte-litter saprotroph-soil saprotroph-undefined saprotroph	623	2 656
Fungal parasite	Fungal parasite	82	0
	Fungal parasite-plant pathogen-plant saprotroph	30	0
	Fungal parasite-undefined saprotroph	1617	895
Plant	Plant pathogen	7 873	3 184
	Plant saprotroph-wood saprotroph	118	124
Saprotroph	Soil saprotroph	464	199
	Undefined saprotroph	64 028	75 799
	Undefined saprotroph-wood saprotroph	0	173
	Wood saprotroph	0	27
Unknown	Unknown	12 886	13 115

FCK means empty control group; FEj2 means *Pseudomonas* control group.

变形菌门丰度没有显著影响^[27]。吡虫啉、毒死蜱、噻虫嗪和苯醚甲环唑喷施后显著增加了变形菌门丰度^[25]。本研究中嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种对盐胁迫下的水稻幼苗根系内生细菌变形菌门丰度影响不显著、降低了厚壁菌门丰度、增加了拟杆菌门丰度，这一点与芽胞杆菌浸种结果

一致。但是芽胞杆菌浸种不增加根系放线菌门丰度，嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种显著增加放线菌门丰度，这一点与已有研究不同。分析原因，嗜碱假单胞菌 Ej2 增强了水稻幼苗根系在生理层面上的耐盐性，促进了放线菌门的生长。与空白对照的优势菌属比较，嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种

后显著增加了根系中假单胞菌属、根瘤菌属、黄杆菌属和德沃斯氏菌属的相对丰度, 降低了氢噬菌属和志贺氏菌属的丰度。实践证明, 假单胞菌属^[32]、根瘤菌属^[33–34]、黄杆菌属^[35]和德沃斯氏菌属^[36–37]的大部分菌株常常用作生防菌、固氮菌和降解菌, 而志贺氏菌属是人类细菌性痢疾最为常见的病原菌。本研究结果说明, 采用嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种可以增加盐胁迫下的水稻幼苗根系中施氏假单胞菌、嗜碱假单胞菌和根瘤菌的丰度, 降低了黄色氢噬菌的丰度, 在一定程度上会提高盐胁迫下水稻幼苗根系的抗病性。

水稻根系内生真菌主要包括子囊菌门和担子菌门, 其他门丰度比较低, 药剂喷施或浸种显著影响门水平的丰度。噻虫嗪喷施后的水稻根系主要包括子囊菌门和担子菌门, 子囊菌门丰度下降、担子菌门丰度增加^[26]。嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后, 盐胁迫下水稻幼苗根系中子囊菌门丰度下降, 担子菌门丰度没有显著变化, 但被孢霉门和油壶菌门的丰度显著增加。假单胞菌浸种后, 伴随水稻种子萌发和幼苗根系生长, 能够稳定定殖在根系中, 协助寄主从盐胁迫环境中吸收营养, 从而为根系内的一些微生物提供营养、促进该类微生物的繁殖。嗜碱假单胞菌 Ej2 在以前的研究中被证实对镰刀菌等多种病原菌有明显的拮抗作用(待发表), 浸种后会抑制根系中的一些病原菌生长, 从而降低它们的丰度。本研究采用高通量测序技术检测出嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后的盐胁迫下水稻幼苗根系中内生优势真菌属组成发生较大变化, 降低了光黑壳属、裂壳属、镰孢菌、曲霉属的丰度, 在种水平上栖土光黑壳、*N. rubicola*、*G. intricans*、帚状曲霉及未分类镰刀菌丰度明显下降。已有研究表明, 假单胞菌具有广泛的防病促生效果^[5,26], 据推测嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种可能会提高盐胁迫下水稻幼苗根系的抗病性。

基于高通量测序技术分析水稻内生菌的研究主要集中在内生菌的群落结构与多样性分析上, 针对内生菌的功能研究相对较少。本研究采用高通量测序结果进行了盐胁迫下水稻幼苗根系内生细菌群落的 PICRUST2 功能预测和内生真菌群落的 FUNGuild 功能预测分析, 研究发现, 水稻幼苗根系内生细菌主要涉及代谢、遗传信息处理等 6 个一级功能代谢通路, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理增加了参与代谢通路的内生细菌丰度; 盐胁迫下水稻幼苗根系内生真菌主要包括病原菌、共生菌和腐生菌, 嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种处理增加了动物病原真菌、菌根真菌和内生真菌的丰度, 降低了腐生真菌和植物病原菌的丰度。植物内生菌与寄主植株具有共生关系, 不仅影响植株吸收营养物质, 而且决定着植株健康生长与存活。不同群落组成和丰度的植株内生菌具有不同的功能基因, 显著影响寄主体内的合成代谢途径, 从而形成了植株品种具有不同的抗性^[38]。特别是碳水化合物代谢、游离氨基酸代谢以及维生素代谢等对植物的抗逆性具有重要作用^[39]。本研究采用嗜碱假单胞菌 Ej2 浸种后, 盐胁迫下水稻幼苗根系中的二级代谢功能层中碳水化合物代谢、游离氨基酸代谢以及维生素代谢的内生细菌丰度显著增加。由此推测, 假单胞菌浸种改变了盐胁迫下水稻幼苗根系内生菌的群落组成和丰度, 改变了植株内部的各种代谢合成途径, 由此改变了根系的抗逆性。

参考文献

- [1] 肖丹丹, 李军, 邓先亮, 卫平洋, 唐健, 韦还和, 陈英龙, 戴其根. 不同品种稻米品质形成对盐胁迫的响应. 核农学报, 2020, 34(8): 1840–1847.
Xiao DD, Li J, Deng XL, Wei PY, Tang J, Wei HH, Chen YL, Dai QG. Response of quality formation of different rice varieties to salt stress. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, 34(8): 1840–1847. (in Chinese)

- [2] 程海涛, 姜华, 薛大伟, 郭龙彪, 曾大力, 张光恒, 钱前. 水稻芽期与幼苗前期耐碱性状 QTL 定位. *作物学报*, 2008, 34(10): 1719–1727.
Cheng HT, Jang H, Xue DW, Guo LB, Zeng DL, Zhang GH, Qian Q. Mapping of QTLs underlying tolerance to alkali at germination and early seedling stages in rice. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(10): 1719–1727. (in Chinese)
- [3] Dagdas YF, Yoshino K, Dagdas G, Ryder LS, Bielska E, Steinberg G, Talbot NJ. Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science*, 2012, 336(6088): 1590–1595.
- [4] 陈立新. 生物农药与化学农药对比分析. 黑龙江大学硕士学位论文, 2010.
- [5] 张望月, 高健, 张超, 张友明, 胡胜标, 李岚岚, 孙运军, 丁学知, 夏立秋. 五种假单胞菌的分离鉴定及其生物活性. *微生物学报*, 2013, 53(9): 957–965.
Zhang WY, Gao J, Zhang C, Zhang YM, Hu SB, Li LL, Sun YJ, Ding XZ, Xia LQ. Isolation, identification and characterization of five *Pseudomonas* strains. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(9): 957–965. (in Chinese)
- [6] 沙月霞, 张昂, 伍顺华, 李明洋. 假单胞菌对水稻防御酶的诱导及定殖能力. *中国植保导刊*, 2020, 40(7): 10–16.
Sha YX, Zhang A, Wu SH, Li MY. Colonization ability of *Pseudomonas* S149 and induction of defense-related enzymes in rice. *China Plant Protection*, 2020, 40(7): 10–16. (in Chinese)
- [7] Ansari M, Shekari F, Mohammadi MH, Juhos K, Végvári G, Biró B. Salt-tolerant plant growth-promoting bacteria enhanced salinity tolerance of salt-tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars at high salinity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2019, 41(12): 1–13.
- [8] Liu Y, Bai FR, Li N, Wang WP, Cheng C. Identification of endophytic bacterial strain RSE1 from seeds of super hybrid rice Shenliangyou 5814 (*Oryza sativa* L.) and evaluation of its antagonistic activity. *Plant Growth Regulation*, 2017, 82(3): 403–408.
- [9] Shahzad R, Khan AL, Bilal S, Waqas M, Kang SM, Lee IJ. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. *Environmental and Experimental Botany*, 2017, 136: 68–77.
- [10] Shylla A, Shivaprakash MK, Shashidhar HE, Vishwakarma P, Sudradhar M. Production of phytohormones by endophytic bacteria isolated from aerobic rice. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2016, 10(3): 2127–2133.
- [11] Shahzad R, Waqas M, Khan AL, Al-Hosni K, Kang SM, Seo CW, Lee IJ. Indoleacetic acid production and plant growth promoting potential of bacterial endophytes isolated from rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *Acta Biologica Hungarica*, 2017, 68(2): 175–186.
- [12] 杨波, 陈晏, 李霞, 任承钢, 戴传超. 植物内生菌促进宿主氮吸收与代谢研究进展. *生态学报*, 2013, 33(9): 2656–2664.
Yang B, Chen Y, Li X, Ren CG, Dai CC. Research progress on endophyte-promoted plant nitrogen assimilation and metabolism. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(9): 2656–2664. (in Chinese)
- [13] Rangjaroen C, Rerkasem B, Teamroong N, Sungthong R, Lumyong S. Comparative study of endophytic and endophytic diazotrophic bacterial communities across rice landraces grown in the highlands of northern Thailand. *Archives of Microbiology*, 2014, 196(1): 35–49.
- [14] Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(8): 827–837.
- [15] Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, Van Der Lelie D. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(3): 748–757.
- [16] Munif A, Hallmann J, Sikora RA. Evaluation of the biocontrol activity of endophytic bacteria from tomato against *Meloidogyne incognita*. *Faculty of Agriculture*, 2000, 65(2b): 471–480.
- [17] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA, Sundaresan V. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *PNAS*, 2015, 112(8): E911–E920.
- [18] Lamit LJ, Lau MK, Sthultz CM, Wooley SC, Whitham TG, Gehring CA. Tree genotype and genetically based growth traits structure twig endophyte communities. *American Journal of Botany*, 2014, 101(3): 467–478.
- [19] Sasaki K, Ikeda S, Ohkubo T, Kisara C, Sato T, Minamisawa K. Effects of plant genotype and nitrogen level on bacterial communities in rice shoots and roots. *Microbes and Environments*, 2013, 28(3): 391–395.
- [20] Pham VTK, Rediers H, Ghequire MGK, Nguyen HH, De Mot R, Vanderleyden J, Spaepen S. The plant

- growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. *Archives of Microbiology*, 2017, 199(3): 513–517.
- [21] Defez R, Andreozzi A, Bianco C. The overproduction of indole-3-acetic acid (IAA) in endophytes upregulates nitrogen fixation in both bacterial cultures and inoculated rice plants. *Microbial Ecology*, 2017, 74(2): 441–452.
- [22] Yang T, Chen Y, Wang XX, Dai CC. Plant symbionts: keys to the phytosphere. *Symbiosis*, 2013, 59(1): 1–14.
- [23] West ER, Cother EJ, Steel CC, Ash GJ. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*, 2010, 56(3): 209–216.
- [24] 柴阳阳. DBP 对蔬菜叶际、根际微生物和内生菌群落结构的影响. 青岛科技大学硕士学位论文, 2018.
- [25] 崔凯. 三种农药在水稻中的吸收富集规律及对水稻内生菌群多样性的影响. 青岛科技大学硕士学位论文, 2017.
- [26] 崔凯, 葛静, 柴阳阳, 杨丽璇, 程江峰, 余向阳. 噻虫嗪对水稻内生真菌群落组成的影响. *江苏农业学报*, 2017, 33(4): 802–808.
- Cui K, Ge J, Chai YY, Yang LX, Cheng JF, Yu XY. Changes of endophytic fungal community in rice plants exposed to thiamethoxam. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 33(4): 802–808. (in Chinese)
- [27] 沙月霞, 沈瑞清. 芽胞杆菌浸种对水稻内生细菌群落结构的影响. *生态学报*, 2019, 39(22): 8442–8451.
- Sha YX, Shen RQ. Impact of seed soaked by *Bacillus* on endophytic bacterial community structure of rice. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(22): 8442–8451. (in Chinese)
- [28] 田雪莹. 砂引草内生菌多样性及一株内生菌 *Alternaria* sp. P8 次级代谢产物研究. 中国农业科学院硕士学位论文, 2018.
- [29] Hu QL, Tan L, Gu SS, Xiao YS, Xiong XY, Zeng WA, Feng K, Wei Z, Deng Y. Network analysis infers the wilt pathogen invasion associated with non-detrimental bacteria. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2020, 6: 8.
- [30] Wang WF, Zhai YY, Cao LX, Tan HM, Zhang RD. Endophytic bacterial and fungal microbiota in sprouts, roots and stems of rice (*Oryza sativa* L.). *Microbiological Research*, 2016, 188/189: 1–8.
- [31] 柴新义, 柴钢青, 向玉勇, 张微微, 殷培峰. 青檀叶片内生和附生真菌组成及生态分布. *生态学报*, 2016, 16: 5163–5172.
- Chai XY, Chai GQ, Xiang YY, Zhang WW, Yin PF. Composition and ecological distribution of endophytic and epiphytic fungi from the foliage of *Pteroceltis tatarinowii*. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(16): 5163–5172. (in Chinese)
- [32] 沙月霞, 张昂, 伍顺华, 沈瑞清. 防治稻瘟病假单胞菌的筛选及效果评价. *中国生物防治学报*, 2020, 36(2): 249–257.
- Sha YX, Zhang A, Wu SH, Shen RQ. Screening and efficiency evaluation of *Pseudomonas* strain in the control of *Magnaporthe oryzae*. *Chinese Journal of Biological Control*, 2020, 36(2): 249–257. (in Chinese)
- [33] 韦兴迪, 曾庆飞, 韦鑫, 李亚娇, 欧二绫, 刘正书. 贵州岩溶山区多花木蓝根瘤菌及高效菌株筛选. *草地学报*, 2021, 29(11): 1605–1613.
- Wei XD, Zeng QF, Wei X, Li YJ, Ou EL, Liu ZS. The rhizobia and high efficient strains screening of *Indigofera amblyantha* in Karst mountain region of Guizhou. *Acta Agrestia Sinica*, 2021, 29(11): 1605–1613. (in Chinese)
- [34] 梁静. 黄河三角洲野大豆根瘤菌多样性及耐盐促生菌株筛选. 中国农业科学院硕士学位论文, 2021.
- [35] Hahm SS, Kim JT, Han KS, Kim BR, Kim HK, Nam YK, Yu SH. Biocontrol efficacy of endophytic bacteria *Flavobacterium hercynim* EPB-C313 for control of Chinese cabbage club root. *Research in Plant Disease*, 2012, 18(3): 210–216.
- [36] Wang G, Wang YX, Ji F, Xu LM, Yu MZ, Shi JR, Xu JH. Biodegradation of deoxynivalenol and its derivatives by *Devosia insulae* A16. *Food Chemistry*, 2019, 276: 436–442.
- [37] 李笑樱. 降解呕吐毒素德沃斯氏菌的饲用安全性和有效性评价. 中国农业大学博士学位论文, 2015.
- [38] 黄子粤, 刘文君, 覃仁柳, 庞师婵, 肖健, 杨尚东. 不同品种南瓜内生细菌多样性及 PICRUSt 基因功能预测分析. *中国农业科学*, 2021, 54(18): 4018–4032.
- Huang ZY, Liu WJ, Qin RL, Pang SC, Xiao J, Yang SD. Endophytic bacterial community composition and PICRUSt gene functions in different pumpkin varieties. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(18): 4018–4032. (in Chinese)
- [39] 燕辉, 彭晓邦, 薛建杰. NaCl 胁迫对花棒叶片光合特性及游离氨基酸代谢的影响. *应用生态学报*, 2012, 23(7): 1790–1796.
- Yan H, Peng XB, Xue JJ. Effects of NaCl stress on leaf photosynthesis characteristics and free amino acid metabolism of *Heyedysarum scoparium*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(7): 1790–1796. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)