



水稻种子内生泛菌(*Pantoea* spp.)系统发育多样性及其促生功能

郭鹤宝^{1#}, 何山文^{1#}, 王星¹, 章俊^{1,2}, 张晓霞^{1*}

¹ 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 农业农村部农业微生物资源收集与保藏重点实验室, 北京 100081

² 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070

摘要:【目的】*Pantoea* 菌株是广泛分布在自然界中的一类功能多样的细菌。本研究对分离自水稻种子内生的 *Pantoea* 菌株进行系统发育分析及功能评价, 从而确定分类地位、种类多样性、分布特征及功能特性。【方法】采用乙醇-次氯酸钠联合灭菌方法进行水稻种子的表面灭菌, 进行内生细菌的分离与纯化; 其次将纯化后的菌株进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增及序列分析, 通过 MEGA 7 软件构建系统发育树; 将分离得到的菌株进行功能实验检测, 如溶磷、产 IAA、产铁载体、拮抗病原真菌等特性, 最后检测菌株的溶血性; 水稻分型采用 SSR 方法, 并对水稻农学性状如分蘖数、株高、植株重及产量进行调查。【结果】本研究对分离自 8 个不同基因型水稻种子中的 146 株内生 *Pantoea* 菌株进行系统发育分析及功能评价, 结果发现所分离到的泛菌菌株主要属于 *Pantoea dispersa*、*Pantoea agglomerans*、*Pantoea cypripedii* 以及 *Pantoea brenneri* 四个种, 其中 *P. dispersa* 的菌株数量最多, 分布最广, 并且存在于所有的 8 个水稻种子样品中。对其中 66 株菌进行功能检测, 发现 86.3% 和 69.7% 的菌株具有溶磷和产 IAA 能力, 有 7 株菌具有产铁载体能力, 未发现对真菌病害 *Fusarium moniliforme* 有拮抗作用的菌株, 并发现 3 株菌具有溶血性; 本实验未发现泛菌组成与水稻系统发育及农学性状存在明显的相关性。【结论】本研究首次对水稻种子中泛菌的多样性及其功能进行报道, 发现不同基因型的水稻种子所含 *Pantoea* 种类及组成存在差异, 种子选择性地积累了 *Pantoea* 类群, 大部分菌株具有一定的促生特性。该研究结果有助于进一步探究微生物与植物的共进化、种子微生物的传播途径及作用方式。

关键词: *Pantoea*, 水稻种子, 内生细菌, 促生功能

泛菌属(*Pantoea*)是一类革兰氏阴性菌, 属于肠杆菌科, 细胞呈直杆状, 大多数菌株能产生黄色素。泛菌属的模式菌种成团泛菌(*P. agglomerans*) 1888 年被 Beijerinck 发现, 并命名为 *Bacillus*

基金项目: 国家自然科学基金(31670005); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2019XK07)

*通信作者。Tel: +86-10-82105087; E-mail: zhangxiaoxia@caas.cn

#共同第一作者。

收稿日期: 2018-12-24; 修回日期: 2019-04-05; 网络出版日期: 2019-07-16

agglomerans, 后来于 1972 年被 Ewing and Fife 命名为 *Enterobacter agglomerans*, 1989 年 Gavini 依据现有分类标准将其定为泛菌属^[1], 截止目前该属一共有 26 个种(<http://www.bacterio.net/-allnamesmr.html>)。泛菌在自然界分布广泛, 主要存在于水中、土壤中, 不同的寄主包括植物、人以及昆虫等也都有分布^[2]。近期研究发现, 泛菌还存在于多种植物的种子中, 且多为优势类群^[3]。本实验室前期研究发现 *Pantoea*、*Acinetobacter* 以及 *Xanthomonas* 为水稻的核心类群。Rahman 等对来自于不同的品种、地理位置和世代的大麦内生微生物组进行研究, 均检测到 *Paenibacillus*、*Pantoea* 和 *Pseudomonas* 相关类群, 并表明在温室条件下具有促进植物生长和抵抗真菌性病害等功能^[4]; 连续 3 代的 *Crotalaria pumila* 种子中也均检测到 *Pantoea*^[5]; 在连续 3 代的萝卜种子中, 发现 *Pantoea* 和 *Pseudomonas* 也是主要类群^[6]。由此可见, *Pantoea* 可能是植物种子内生细菌的一个重要类群。

综上所述, 泛菌是一类广泛存在于自然界且功能多样的微生物, 在植物的种子这个特殊生境中, 种子内生泛菌的研究目前多限于在种群水平上的描述, 而对其系统发育、分布及功能尚缺乏系统研究。本研究将对分离自 8 个不同水稻基因型的种子内生泛菌菌株进行 16S rRNA 基因的系统发育分析、分布特征及其对植物相关促生功能进行评价。

1 材料和方法

1.1 样品来源及培养基配制

1.1.1 样品采集及处理: 水稻种子由武汉大学李阳生教授实验室所提供, 来源信息如表 1 所示。水稻的表型性状在 2015 年 8 月(抽穗期)进行调查, 采集水稻完整植株, 对每个品种采用对角线法采集三束水稻植株, 即每个品种 3 个重复, 分别测量其株高、分蘖数、植株鲜重以及植株干重, 并记录。然后于 2015 年 10 月(水稻收获期)测量不同水稻品种的稻谷产量, 并作相应记录。用于拮抗实验的指示菌株为 *F. moniliforme*, ACCC 36127 来源于中国农业微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 培养基配制: (1) TSA 培养基(Difco)^[7]; 无机磷培养基^[8]; IAA 检测培养基^[9]; CAS 蓝色定性检测固体培养基^[10]。(2) PDA 固体培养基: 马铃薯提取液 1.0 L, 葡萄糖 20.0 g, 琼脂 15.0 g, 自然 pH。(3) 马铃薯提取液的制备: 取去皮马铃薯 200 g, 切成小块, 加水 1000 mL 煮沸 30 min, 滤去马铃薯块, 将滤液补足至 1000 mL。(4)血平板: 血平板购买自北京大宏生物有限公司。

1.2 水稻种子表面灭菌

采用乙醇-次氯酸钠联合灭菌方法^[11]对水稻种子进行表面灭菌。剥壳的 5 g 水稻种子放入无菌培养皿中, 无菌水冲洗 3 次, 无菌滤纸擦干水分, 依次用 70%乙醇处理 3 min, 1% NaClO (有效氯)

表 1. 8 个水稻品种信息来源表

Table 1. Information sources of 8 rice varieties

Number	Variety name	Breeding site	Number	Variety name	Breeding site
2	YTA/031	Ezhou, Hubei	6	08S-23//CHAO 2R/Fengfuzhan	Ezhou, Hubei
3	S-S1//CHAO 2R/Fengfuzhan	Ezhou, Hubei	9	4A/9311MUT	Ezhou, Hubei
4	Y58S//6096/CHAO 2R	Ezhou, Hubei	19	4A/1410932	Ezhou, Hubei
5	YTA// CHAO 2R/ Fengfuzhan	Ezhou, Hubei	22	Tianlong No. 1	Commercial products

处理 1 min, 70%乙醇处理 30 s, 最后用无菌水冲洗 6 次。最后一次水洗后吸取 100 μ L 水涂布 TSA 平板上, 并将表面灭菌的种子按压于 TSA 平板上, 检测种子表面是否灭菌彻底。

1.3 水稻种子内生细菌的分离与纯化

取 5 g 表面灭菌后的种子于无菌研钵中研磨成粉末, 然后将粉末加入装有玻璃珠的 50 mL 无菌水中, 30 $^{\circ}$ C 振荡 30 min 摇匀, 即为 10^{-1} 稀释液, 吸取 1 mL 10^{-1} 稀释液到 9 mL 无菌水中, 吹吸均匀, 即为 10^{-2} 稀释液, 用无菌水稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释液。然后依次从 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 稀释液中吸取 100 μ L 稀释液涂布到 TSA 培养基上, 每个稀释度 3 个重复。30 $^{\circ}$ C 下培养 3–5 d。挑取不同形态的菌落平板划线并进一步纯化, 并用终浓度为 25% 的甘油保藏菌株, 于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中放置。

1.4 水稻种子内生细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增及序列分析

采用煮沸法获得 DNA 模板, 并采用通用引物 27F 和 1492R, 进行单向测序, 正常序列长度约为 700 bp。将测序后的结果在 Ezbiocloud 网站上 (www.ezbiocloud.net/eztaxon) 进行序列比对, 通过 MEGA 7.0 软件进行系统发育分析。

1.5 溶磷实验

微生物通过产生有机酸类等物质溶解土壤中植物不易吸收的无机磷化合物, 促使土壤中无效磷的溶解及利用。实验方法主要参照上述标注文献中, 将活化的目的菌株点接到无机溶磷培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养 1 周左右, 测量菌落直径 d1, 溶磷圈直径 d2, 将溶磷圈直径 d2 与菌落直径 d1 的比值作为评价溶磷能力的标准, 比值越大即表明菌株溶磷能力越强。

1.6 产 IAA 实验

色氨酸是植物生长素 IAA (吲哚乙酸) 的合成前体, 在培养基中加入色氨酸可诱导微生物合成

IAA。采用 Salkowski 比色法测定内生细菌分泌植物生长激素(IAA)。

1.7 产铁载体实验

依据 Machuca 和 Milagres 描述的方法进行检测目的菌株是否具备产生铁载体的能力。

1.8 拮抗试验

将活化好的细菌点接到 TSA 平板上, 一个平板点接 4 个接菌点, 并在 4 个接菌点的中央点接病原真菌 *F. moniliforme*, 30 $^{\circ}$ C 培养 1 周并观察结果。如果对病原真菌有拮抗作用, 病原真菌就不能覆盖细菌生长, 即能够形成明显的抑菌圈。

1.9 溶血实验

在每个新鲜的血平板上划线接种 4 个菌, 30 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后观察。溶血分为 α 溶血(不完全性溶血, 产生草绿色溶血环)、 β 溶血(完全性溶血, 呈界限分明、无色透明的溶血环)以及不溶血。

1.10 SSR 分子标记技术

本研究共对 8 个品种的水稻进行 SSR 法分型并构建进化树。43 对 SSR PCR 引物的设计、扩增的反应体系和反应条件参照文献[12]。然后将 PCR 产物在 3% 高分辨率凝胶(Metaphor Agarose)上进行凝胶电泳, 电压 80 V, 时间 80 min。读取多态性条带, 并利用 NTsys 2.10e 软件进行聚类分析。

2 结果和分析

2.1 水稻内生细菌分离及 16S rRNA 基因的系统发育分析

8 个不同基因型的水稻种子中共挑取 241 株细菌, 对分离的内生菌进行 16S rRNA 基因初步鉴定, 经 Ezbiocloud 比对后发现, 其中 146 株细菌属于泛菌属(*Pantoea* spp.), 占分离细菌总数的 60.6%。所有分离到的泛菌及其相近的模式菌种构建的系统发育树(邻接法)如图 1 所示。所分离到

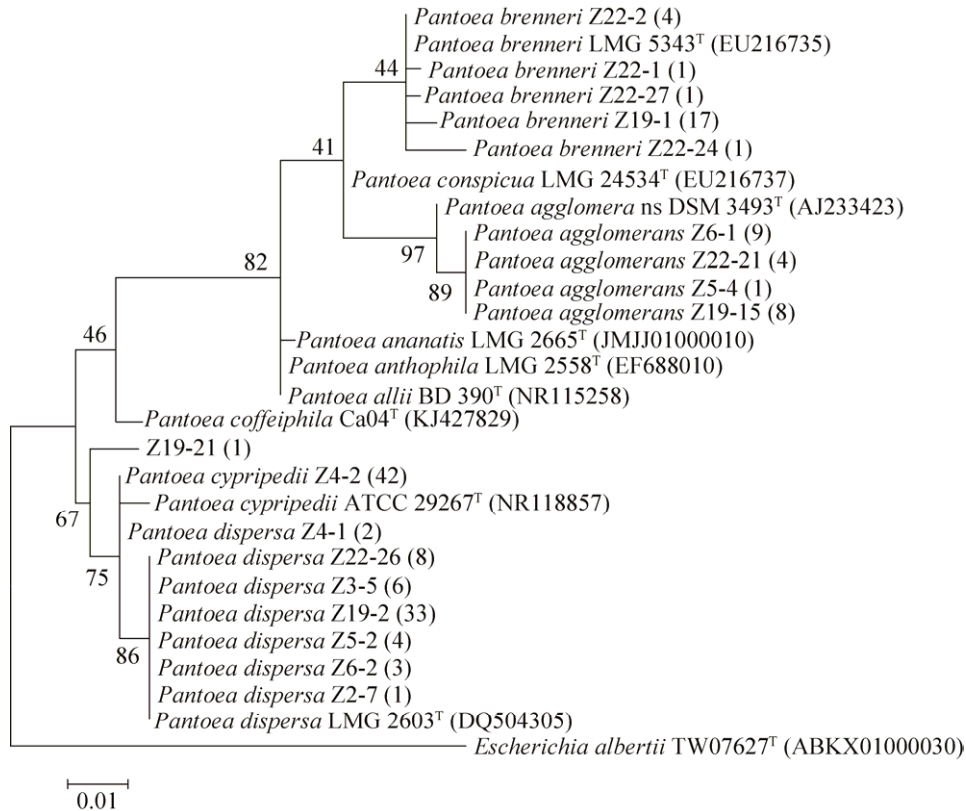


图 1. 依据 16S rRNA 基因构建的系统发育分离自水稻种子中泛菌属(*Pantoea* spp.)菌株进化树(NJ 法)

Figure 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of endophytic bacteria isolated from rice seeds. GenBank accession numbers are given in parentheses; numbers in parentheses after the number of isolated strains represent the number of strains of the same group; numbers at branch points are percentage bootstrap (values based on 1000 replicates); the scale bar represents 0.01 changes per nucleotide.

的泛菌菌株主要分布在 *P. dispersa*、*P. agglomerans*、*P. cyripedii* 以及 *P. brenneri* 四个种中，各类群分布及其所占比例见图 2 所示。

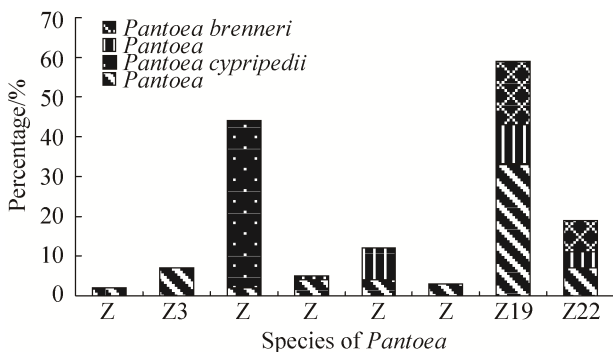


图 2. 分离的泛菌属菌株在 8 个不同水稻品种中的分布
Figure 2. Distribution of 8 different species of *Pantoea* in each genotype rice seeds.

根据进化树及比对结果发现，有 57 株菌属于 *P. dispersa*，分布在所有分离到泛菌菌株的 8 个水稻种子样品中，同时该种是本研究中数量最多、分布最广的一类。除 Z4-1 所代表的两株菌与模式菌 *P. dispersa* LMG 2603^T 相似性为 99.78% 外，其他相似性均为 100%。值得指出的是，Z4-1 与 *P. dispersa* LMG 2603^T 16S rRNA 基因相似性最高，仅 2 个碱基的差异，而与 *P. cyripedii* 有 6 个碱基的差异，但是在系统进化树上却与 *P. cyripedii* 聚为一类，因而其确切分离地位还需通过多相分类方法进一步确定。

属于 *P. agglomerans* 的菌株一共有 22 株，各个菌株间的 16S rRNA 基因相似性均为 100%，与

P. agglomerans 模式菌株 DSM 3493^T 的相似性均为 99.56%，分布在 5、6、19、22 号种子中。

P. brenneri 主要分布在 19 号和 22 号样品中，共 24 株菌株属于该种，其中 17 株分离自 19 号样品，菌种间 16S rRNA 基因相似性为 100%，与 *P. brenneri* 模式菌株 LMG 5343^T 相似性为 99.71%；22 号样品中，分离到的 7 株该类群的菌株，但菌株间系统发育存在明显的分化，其中 Z22-2 所代表的 4 株菌间相似性为 100%，与模式菌 LMG 5343^T 相似性为 99.72%；而 Z22-27、Z22-24 与模式菌株 LMG 5343^T 相似性分别为 99.85% 和 99.41%，二者各自单独成一个分支。

隶属于 *P. cypripedii* 的 42 株菌均来自于 4 号样品，且菌株间相似性为 100%，与模式菌 ATCC 29267^T 的相似性为 99.69%。

此外，Z19-21 与 *P. dispersa* LMG 260^T 及 *P. cypripedii* ATCC 29267^T 相似性分别是 99.25% 和 99.26%，单独形成一个分支，具体是否属于新的类群还需要通过多相分类进行确定。

2.2 泛菌菌株的植物促生功能

本研究一共选择了 66 株菌进行溶磷、产植物生长素 IAA、产铁载体以及抗植物真菌病害等与植物促生功能相关的试验(表 2)。

2.2.1 溶磷功能：溶解无机磷的菌株通过分泌一些酸性物质，并向周围的培养基中扩散，使菌落周围的磷酸盐溶解，通过溶磷圈的直径 d2 和菌落的直径 d1 的比值确定溶磷能力大小，比值越大即溶磷能力越强，溶磷能力 d2/d1 值在 1.0–2.0 属于溶磷能力中等菌株。通过培养 1 周后发现，共 55 株菌具有溶磷能力，占总筛选菌株的 83.3%。另外，有 43 菌株 d2/d1 在 1.0–2.0，属于中等溶磷能力菌株；d2/d1 ≥ 2.0 的菌株共计有 11 株，属于强溶磷

能力的菌株，这些菌分别属于 *P. dispersa*、*P. agglomerans*、*P. cypripedii* 以及 *P. brenneri*，即所分离到 4 个种中均有较高溶磷能力的菌株。在 *P. brenneri* 中，溶磷能力最高的菌株为 Z19-38，其 d2/d1 为 3.15；*P. dispersa* 中，菌株 Z19-90 的溶磷能力较高，d2/d1 为 2.85；*P. agglomerans* 中，能力较高的菌株为 Z6-7，d2/d1 为 2.39；*P. cypripedii* 中 Z4-11 菌株的溶磷能力较高，比值为 2.00。

2.2.2 分泌 IAA 能力测定：加入 Salkowski 比色液后，溶液颜色变为粉红色即为具有分泌 IAA 能力的菌株，颜色越深即分泌 IAA 能力越强，经过初筛发现 46 株菌具有 IAA 产生能力。在定性检测基础上，通过比色法进行定量检测，发现菌株分泌 IAA 浓度为 29.74–431.11 mg/L。其中，*P. agglomerans* Z6-7 分泌 IAA 能力最强，IAA 的含量为 431.11 mg/L；*P. cypripedii* Z4-12、*P. brenneri* Z19-80 及 *P. Dispersa* Z19-33 均具有较强的分泌 IAA 能力，分别为 428.65、388.42 和 391.32 mg/L。

2.2.3 产铁载体能力测定：铁载体检测通常采用定性初筛及 A/Ar 比值的相对定量实验，认为 A/Ar 为 0–0.6 时产铁载体能力较强，0.6–0.8 中等，0.8–1.0 为较弱。经过定量和定性检测结果发现，水稻种子内生菌具有产铁载体功能的菌株数量并不多，仅有 7 株菌具有产铁载体的功能。其中 A/Ar 是 0.6–0.8 的菌株分别为 *P. brenneri* Z19-39、*P. cypripedii* Z4-10、*P. dispersa* Z2-7、*P. brenneri* Z19-76 以及 *P. brenneri* Z19-37，表明这些菌株产铁载体能力属于中等水平，其中 *P. brenneri* Z19-39 相比于其他种来说产铁载体能力更强，即比值为 0.62；*P. cypripedii* Z4-23 和 *P. cypripedii* Z4-11 的 A/Ar 分别为 0.82 和 0.86，具有产铁载体能力，但

表 2. 水稻种子内生 *Pantoea* 促生功能及溶血性结果Table 2. Growth promoting function and hemolytic results of endophytic *Pantoea* in rice seeds

Number	Top-hit taxon	Phosphorus solubilization (d2/d1)	IAA/(mg/L)	Siderophore (A/Ar)	Antagonism	Hemolysis	GenBank accession No.
Z2-7	<i>Pantoea dispersa</i>	1.02±0.04	–	0.70±0.11	–	β -hemolytic	MF176579
Z3-7	<i>Pantoea dispersa</i>	1.80±0.04	234.10±8.09	–	–	–	MK322438
Z3-6	<i>Pantoea dispersa</i>	1.88±0.10	167.19±0.78	–	–	–	MF176580
Z3-5	<i>Pantoea dispersa</i>	2.25±0.06	139.35±1.45	–	–	–	MF176624
Z4-6	<i>Pantoea cypripedii</i>	1.45±0.06	174.52±0.89	–	–	–	MK318638
Z4-7	<i>Pantoea dispersa</i>	1.50±0.01	–	–	–	–	MK318639
Z4-10	<i>Pantoea cypripedii</i>	1.18±0.02	264.39±7.70	0.69±0.02	–	–	MK312573
Z4-11	<i>Pantoea cypripedii</i>	2.00±0.08	168.12±4.31	0.86±0.02	–	–	MK312572
Z4-12	<i>Pantoea cypripedii</i>	1.10±0.01	428.65±7.04	–	–	–	MK327827
Z4-13	<i>Pantoea cypripedii</i>	1.16±0.04	272.27±3.22	–	–	–	MK312570
Z4-14	<i>Pantoea cypripedii</i>	1.17±0.04	225.69±6.67	–	–	–	MK281382
Z4-21	<i>Pantoea cypripedii</i>	1.1±0.016	211.47±2.13	–	–	–	MK312590
Z4-22	<i>Pantoea cypripedii</i>	1.23±0.04	220.61±4.03	–	–	–	MK312574
Z4-23	<i>Pantoea cypripedii</i>	1.04±0.04	211.72±20.86	0.82±0.03	–	–	MK312592
Z4-24	<i>Pantoea cypripedii</i>	1.29±0.04	–	–	–	–	MK312589
Z4-25	<i>Pantoea cypripedii</i>	1.94±0.06	43.88±3.08	–	–	–	MK322437
Z4-29	<i>Pantoea cypripedii</i>	–	–	–	–	–	MK312569
Z5-5	<i>Pantoea dispersa</i>	1.75±0.03	–	–	–	–	MK322471
Z5-4	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.14±0.03	–	–	–	β -hemolytic	MK322468
Z5-3	<i>Pantoea dispersa</i>	1.61±0.02	188.88±4.66	–	–	–	MK322461
Z5-2	<i>Pantoea dispersa</i>	–	–	–	–	–	MK322442
Z6-9	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.31±0.02	390.57±2.89	–	–	–	MF176633
Z6-8	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.30±0.02	430.19±8.42	–	–	–	MF176632
Z6-7	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.39±0.06	431.11±5.14	–	–	–	MF176512
Z6-3	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.45±0.07	286.59±8.38	–	–	–	MF176630
Z6-1	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.41±0.04	350.20±15.36	–	–	–	MF176629
Z19-1	<i>Pantoea brenneri</i>	2.50±0.11	305.69±14.06	–	–	–	MK318656
Z19-2	<i>Pantoea dispersa</i>	2.07±0.04	–	–	–	–	MK322469
Z19-7	<i>Pantoea dispersa</i>	1.58±0.10	193.89±4.74	–	–	–	MK322456
Z19-8	<i>Pantoea dispersa</i>	1.11±0.03	155.20±5.71	–	–	β -hemolytic	MK322470
Z19-13	<i>Pantoea dispersa</i>	1.52±0.04	171.14±3.45	–	–	–	MK322467
Z19-14	<i>Pantoea dispersa</i>	1.19±0.02	–	–	–	–	MK322441
Z19-15	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.29±0.04	–	–	–	–	MK322462
Z19-19	<i>Pantoea dispersa</i>	–	81.99±5.63	–	–	–	MK318657
Z19-33	<i>Pantoea dispersa</i>	1.14±0.07	391.32±13.57	–	–	–	MK322502
Z19-34	<i>Pantoea dispersa</i>	1.08±0.03	–	–	–	–	MK322500
Z19-35	<i>Pantoea brenneri</i>	0.60±0.02	328.35±25.52	–	–	–	MK322503
Z19-36	<i>Pantoea dispersa</i>	1.78±0.01	231.2±16.56	–	–	–	MK322504
Z19-37	<i>Pantoea brenneri</i>	1.09±0.03	379.13±4.07	0.80±0.05	–	–	MK322509
Z19-38	<i>Pantoea brenneri</i>	3.15±0.27	–	–	–	–	MK318660

(待续)

(续表 2)

Z19-39	<i>Pantoea brenneri</i>	1.29±0.06	162.59±9.67	0.62±0.03	–	–	MK322510
Z19-51	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.08±0.04	–	–	–	–	MK322508
Z19-52	<i>Pantoea dispersa</i>	1.72±0.02	182.95±7.67	–	–	–	MK318659
Z19-56	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.05±0.04	–	–	–	–	MK322501
Z19-59	<i>Pantoea dispersa</i>	1.18±0.03	328.92±7.84	–	–	–	MK322464
Z19-62	<i>Pantoea dispersa</i>	1.24±0.07	–	–	–	–	MK322465
Z19-63	<i>Pantoea dispersa</i>	1.63±0.04	122.76±4.35	–	–	–	MK322466
Z19-64	<i>Pantoea brenneri</i>	1.13±0.04	29.74±2.77	–	–	–	MK322457
Z19-67	<i>Pantoea dispersa</i>	1.26±0.06	–	–	–	–	MK322460
Z19-68	<i>Pantoea dispersa</i>	1.37±0.04	158.6±3.36	–	–	–	MK322458
Z19-69	<i>Pantoea dispersa</i>	1.44±0.04	182.81±7.16	–	–	–	MK322459
Z19-71	<i>Pantoea brenneri</i>	2.25±0.07	304.12±15.34	–	–	–	MK322463
Z19-73	<i>Pantoea brenneri</i>	1.04±0.03	–	–	–	–	MK322434
Z19-74	<i>Pantoea dispersa</i>	1.71±0.02	63.76±2.85	–	–	–	MK322433
Z19-75	<i>Pantoea dispersa</i>	1.17±0.04	138.43±1.64	–	–	–	MK322435
Z19-76	<i>Pantoea brenneri</i>	2.00±0.62	–	0.72±0.02	–	–	MK322436
Z19-77	<i>Pantoea dispersa</i>	1.00±0.02	–	–	–	–	MK322440
Z19-78	<i>Pantoea dispersa</i>	1.22±0.02	268.11±23.95	–	–	–	MK322439
Z19-79	<i>Pantoea brenneri</i>	1.06±0.03	38590±5.28	–	–	–	MK322432
Z19-80	<i>Pantoea brenneri</i>	1.13±0.10	388.42±16.57	–	–	–	MK313695
Z19-90	<i>Pantoea dispersa</i>	2.85±0.04	351.56±2.57	–	–	–	MK313703
Z19-96	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.13±0.05	425.71±30.27	–	–	–	MK313697
Z22-21	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.13±0.04	349.97±18.34	–	–	–	MK313698
Z22-24	<i>Pantoea brenneri</i>	2.38±0.03	–	–	–	–	MK313700
Z22-25	<i>Pantoea brenneri</i>	2.23±0.07	306.06±19.96	–	–	–	MK313699
Z22-26	<i>Pantoea dispersa</i>	1.21±0.03	166.80±2.89	–	–	–	MK313696

是活性相对较弱；此外，本研究中未发现产铁载体能力较强的菌株。

2.2.4 拮抗作用：对所有菌株进行拮抗病原菌 *F. moniliforme* 的实验，并未发现抗菌活性的菌株。

2.3 溶血实验

对 66 株菌进行溶血实验，结果发现有 3 株菌呈现阳性，分别为 *P. dispersa* Z19-19、*P. dispersa* Z19-35 和 *P. agglomerans* Z19-77，可以初步说明这 3 株具有人畜致病风险。除溶血性之外，菌株对植物的致病风险尚需我们进行进一步深入的评价。

2.4 水稻种子 SSR 分子标记遗传多态性分析

利用 NTsys 2.10e 软件分析这 8 个品种的水稻遗传多态性，并构建了水稻基因型的聚类图，见图 3。从结果我们可以看出，以遗传相似系数 0.68 为阈值，可以将 8 个基因型的水稻分为两大类群。其中第一类群包含 7 个基因型的水稻品种，编号分别为 2、3、4、5、6、9、19；而第二大类群有 1 个基因型的水稻品种，编号为 22，该品种为市售样品，其他均为有亲缘关系的杂交稻，因此该样品与其他样品亲缘关系较远。结合图 2 分析，发现泛菌的组成与水稻亲缘关系间并不存在明显的相关性。

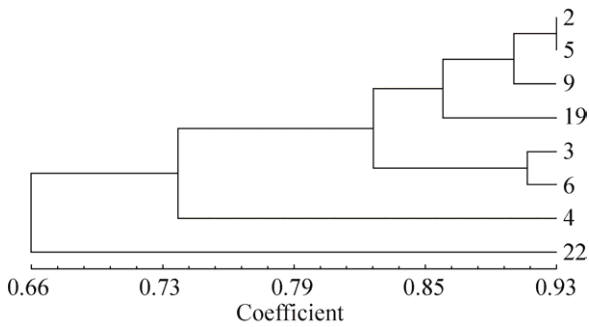


图 3. 8 个水稻品种 SSR 分子标记遗传多态性分析图
Figure 3. Analysis of genetic polymorphisms of SSR molecular markers in 8 rice varieties.

2.5 不同水稻品种的表型特征分析

8 个不同基因型水稻品种的株高、分蘖数、植株鲜重、植株干重以及稻谷产量记录如表 3 所示。其中 19 号水稻样品的株高及稻谷产量最高；4 号水稻分蘖数及干重最高；根据图 2 可以看出，二者分离的 *Pantoea* 数量要普遍高于其他样品，但因样品数量所限，因此并不能给出明确的结论。

3 讨论

Walterson 和 Stavrindes 对 *Pantoea* 这一类群进行了十分详细的综述性报道，*Pantoea* 的分布极其广泛，功能具有多样性：分离自水体和土壤中

的 *Pantoea* 可以修复和降解农药残留和其他有毒物质；*Pantoea* 作为多种植内生菌具有固氮和促生功能，有些对植物病原菌具有生防作用；近年来从病人的血液尿液中分离到很多 *Pantoea* 菌株，但是其对人的致病性还存在很大的争议。已有的研究中对种子中 *Pantoea* 的组成及功能研究十分有限。

P. dispersa 在本研究中分布在所有测试的水稻种子中，并发现具有溶磷、产 IAA 和铁载体的功能，但其中 2 株发现具有溶血现象。已有研究报道，在高粱、病人的血液以及土壤中分离到过该菌群，并且对葡萄和甘蔗作物具有致病性，但对人的致病性还尚未确定^[13]。从水稻种子分离的内生菌 *P. dispersa* VWB2 发现具有产 IAA、抑制病原真菌 *F. oxysporum* 以及溶解磷的作用^[14]；Selvakumar 等发现分离自土壤中的一株 *P. dispersa* 具有很强的促生功能^[15]。可见，*P. dispersa* 存在是十分广泛的，并被许多研究者进行了深入探究。

P. agglomerans 是泛菌中研究最为广泛的一类菌，也是泛菌属在自然界中分布最广的一类。据统计，*P. agglomerans* 从 16 种植物、14 种昆虫、9 种动物和人的 8 个不同生病部位、水体以及土壤等

表 3. 8 个不同基因型水稻品种的表型特征总结

Table 3. Summary of phenotypic characteristics in 8 different genotypes of rice varieties

Number	Height/cm	Tillers	Fresh weight/g	Dry weight/g	Rice production/(kg/21 m ²)
2	93±4.50 bc	11±0.82 c	132.24±9.73 b	33.45±3.98 ba	14.7
3	88±6.41 c	16±1.41 b	192.58±1.11 a	42.81±1.33 a	18.1
4	92±2.36 bc	19±1.70 a	185.31±18.31 a	43.31±4.15 a	10.8
5	85±1.55 c	15±2.62 b	124.45±18.05 b	29.56±4.32 b	16.5
6	93±3.68 bc	14±0.94 bc	132.33±16.36 b	32.74±4.30 ba	11.2
9	92±2.01 bc	11±1.25 c	155.26±15.31 ba	33.76±2.48 ba	14.6
19	103±2.45 a	11±2.05 c	178.04±40.23 a	39.86±8.05 a	25.2
22	101±7.04 ba	14±0.82 bc	164.70±14.10 ba	41.41±3.28 a	10.1

Different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$, and same lowercase letters are not significantly different at $P > 0.05$ level.

环境中均有发现, 其功能也多种多样。已发现该类群的菌株具有解磷能力和分泌 IAA 的能力, 并且能够显著地促进水稻生长^[16-18], 同时该类群也是 20 多种植物病害的生防菌; 但同时又对许多植物种类造成严重病害, 如造成水稻稻谷褐变^[19-20]、玉米茎褐腐病^[21]、杨树细菌性溃疡病^[22]、棉花烂铃病^[23]、香蕉叶鞘腐败病^[24]等。此外, 该类群发现与人的 15 种以上的疾病相关。从本研究的 23 株 *P. agglomerans* 中, 发现大部分菌株具有产 IAA 和溶磷的能力, 未筛选到具有拮抗真菌病原菌的功能, 也未检测到产铁载体的能力。其中有一株菌具有溶血现象, 可能为潜在的人畜病原菌。

P. brenneri 已有报道均分离自临床材料如伤口、痰液中等, 但未发现对人或者其他动植物的致病性。本研究从两个品种的水稻种子中分离到 24 株该类群的菌种, 且发现大部分菌株具有溶磷功能, 其中菌株 Z19-38 能力最强。同时还发现该类菌具有产 IAA 和铁载体的功能, 并没有发现溶血现象。

P. cyripedii 已有报道主要分离自植物中, 并发现一株分离自 *Stevia rebaudiana* 根际土壤的该类群菌株具有高效的溶磷能力^[25], 近期报道在昆虫 *Kerria lacca* 分泌的蜜汁中分离到该类群的菌株, 但功能未知^[26]。本研究仅从一个品种的水稻种子中分离到该类群菌株, 且发现具有溶磷、产 IAA 和铁载体的功能, 未发现溶血特性。

在此基础上, 本研究还进一步分析了 8 个水稻品种基因型和表型性状与泛菌组成的关系, 因样品的数量所限, 目前尚未发现二者存在着明显的相关性。还需后续增加更多的水稻样品进行深入研究。

综上所述, *Pantoea* 是广泛存在于自然界并且功能多样的一类细菌, 结合本研究的结果及已有

的报道, 可以看出植物种子选择性地积累了 *Pantoea* 类群, 从植物与微生物长期共进化的角度来讲, 植物应该选择对本身有益的微生物类群传递给下一代并在种子萌发及成长过程中发挥重要作用^[27]。本研究的创新点在于首次对分离自水稻种子内生的 *Pantoea* 菌株进行系统分析, 描述其分类地位、分布特征以及其功能特性。进一步的研究将从种子中 *Pantoea* 菌株的作用方式、传播途径以及比较基因组等方面进行更深入的探究。

参考文献

- [1] Tindall BJ. The combination *Enterobacter agglomerans* is to be cited as *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and fife 1972 and the combination *Pantoea agglomerans* is to be cited as *Pantoea agglomerans* (Beijerinck 1888) Gavini *et al.* 1989. Opinion 90. Judicial commission of the international committee on systematics of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64: 3582–3583.
- [2] Walterson AM, Stavriniades J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(6): 968–984.
- [3] Zhang J, Zhang CW, Yang J, Zhang RJ, Gao JS, Zhao X, Zhao JJ, Zhao DF, Zhang XX. Insights into endophytic bacterial community structures of seeds among various *Oryza sativa* L. rice genotypes. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2019, 38(1): 93–102.
- [4] Rahman M, Flory E, Koyro HW, Abideen Z, Schikora A, Suarez C, Schnell S, Cardinale M. Consistent associations with beneficial bacteria in the seed endosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Systematic and Applied Microbiology*, 2018, 41(4): 386–398.
- [5] Sánchez-López AS, Thijs S, Beckers B, González-Chávez MC, Weyens N, Carrillo-González R, Vangronsveld J. Community structure and diversity of endophytic bacteria in seeds of three consecutive generations of *Crotalaria pumila* growing on metal mine residues. *Plant and Soil*, 2018, 422(1/2): 51–66.
- [6] Rezki S, Campion C, Simoneau P, Jacques MA, Shade A, Barret M. Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. *Plant and Soil*, 2018, 422(1/2): 67–79.
- [7] Kawai M, Matsutera E, Kanda H, Yamaguchi N, Tani K, Nasu M. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing

- processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(2): 699–704.
- [8] Fankem H, Nwaga D, Deubel A, Dieng L, Merbach W, Etoa FX. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 2007, 5(24): 2450–2460.
- [9] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2): 793–796.
- [10] Machuca A, Milagres AMF. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 36(3): 177–181.
- [11] Sun L, Qiu FB, Zhang XX, Dai X, Dong XZ, Song W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, 2008, 55(3): 415–424.
- [12] Gupta PK, Rustgi S, Sharma S, Singh R, Kumar N, Balyan HS. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 2003, 270(4): 315–323.
- [13] Xing CH, Na DC. “Phenotype=Genotype+Environment” comprehensive experimental design. *Bulletin of Biology*, 2018, 53(10): 52–53. (in Chinese)
邢彩虹, 那冬晨. “表型=基因型+环境”综合实验设计. *生物学通报*, 2018, 53(10): 52–53.
- [14] Verma SK, Kingsley K, Irizarry I, Bergen M, Kharwar RN, White JF Jr. Seed-vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 122(6): 1680–1691.
- [15] Selvakumar G, Kundu S, Joshi P, Nazim S, Gupta AD, Mishra PK, Gupta HS. Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1A isolated from a sub-alpine soil in the North Western Indian Himalayas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(7): 955–960.
- [16] Feng YJ, Shen DL, Dong XZ, Song W. *In vitro* symplasmata formation in the rice diazotrophic endophyte *Pantoea agglomerans* YS19. *Plant and Soil*, 2003, 255(2): 435–444.
- [17] Chen Q, Liu SJ, Bai Y, Li YX, Gao CH, Zhang Q, Li JH. Screening and identification of phosphate-solubilizing bacteria from reclaimed soil in Shanxi mining area. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2014, 20(6): 1505–1516. (in Chinese)
陈倩, 刘善江, 白杨, 李亚星, 郜春花, 张强, 李建华. 山西矿区复垦土壤中解磷细菌的筛选及鉴定. *植物营养与肥料学报*, 2014, 20(6): 1505–1516.
- [18] Liu J, Lin H, Zhao B. Colonization and growth-promoting properties of endophytic bacteria *Pantoea agglomerans* strain HAUM1 to host rice. *Hubei Agricultural Sciences*, 2011, 50(23): 4820–4824. (in Chinese)
刘佳, 林会, 赵斌. 内生团泛菌HAUM1对宿主水稻的定殖及促生作用. *湖北农业科学*, 2011, 50(23): 4820–4824.
- [19] Xie GL, Xu CY, Ren XP. Characterization of pathogenic *Pantoea agglomerans* from rice seed. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2001, 27(3): 317–320. (in Chinese)
谢关林, 徐传雨, 任小平. 稻谷病原细菌 *Pantoea agglomerans* 的特征化研究. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2001, 27(3): 317–320.
- [20] Hong YC, Hu FP, Huang XN. Pathogenicity of *Pantoea agglomerans* on rice seeds. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2002, 31(1): 32–36. (in Chinese)
洪永聪, 胡方平, 黄晓南. 成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)对稻谷的致病性. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2002, 31(1): 32–36.
- [21] Goszczynska T, Botha WJ, Venter SN, Coutinho TA. Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of maize in South Africa. *Plant Disease*, 2007, 91(6): 711–718.
- [22] Xiang CT, Song FQ, Liu JH, Dong AR, Xue Y, Yuan SZ, Zhang JH, Jiang XD, Shi FX, Wang CW, Lin HB, Han WX. The dominant factors caused by poplar INA bacterial canker. *Journal of Northeast Forestry University*, 2001, 29(3): 109–113. (in Chinese)
项存梯, 宋福强, 柳京花, 董爱荣, 薛煜, 原树忠, 张景华, 姜希德, 史福轩, 王传伟, 林海波, 韩维新. 杨树冰核细菌溃疡病发病的主导因素. *东北林业大学学报*, 2001, 29(3): 109–113.
- [23] Liu YQ, Yang L, Li GY, Ren YZ, Sun LH, He M. Effects of cotton boll rot caused by *Pantoea agglomerans* on cotton traits and yield. *Plant Protection*, 2008, 34(5): 103–106. (in Chinese)
刘雅琴, 杨丽, 李国英, 任毓忠, 孙六华, 何梅. 成团泛菌引起的棉花烂铃病对棉花产量因子和品质的影响. *植物保护*, 2008, 34(5): 103–106.
- [24] Yan YN, He H, Ye YJ, Lu WB, Wen SH, Zhang XQ. Identification of the pathogen causing banana sheath rot disease. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2011, 41(2): 124–130. (in Chinese)
严玉宁, 何红, 叶艺俊, 卢文标, 文尚华, 张秀清. 香蕉叶鞘腐败病原鉴定. *植物病理学报*, 2011, 41(2): 124–130.
- [25] Kaur G, Reddy MS. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. *Pedosphere*, 2015, 25(3): 428–437.
- [26] Shamim G, Sharma KK, Ramani R. Isolation and identification of culturable bacteria from honeydew of Indian

lac insect, *Kerria lacca* (Kerr) (Hemiptera: Tachardiidae).
Meta Gene, 2019, 19: 10–14.

[27] Truyens S, Weyens N, Cuypers A, Vangronsveld J. Bacterial

seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*, 2015, 7(1): 40–50.

Phylogenetic diversity and plant growth-promoting characteristics of endophytic *Pantoea* spp. in rice seeds

Hebao Guo^{1#}, Shanwen He^{1#}, Xing Wang¹, Jun Zhang^{1,2}, Xiaoxia Zhang^{1*}

¹ Key Laboratory of Microbial Resources Collection and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

² Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] The genus *Pantoea* comprises 26 species that are isolated from a multitude of environments. In this study, 146 strains of *Pantoea* isolated from rice seeds of 8 different rice genotypes were systematically analyzed to determine their phylogenetic status, diversity, distribution and functional characteristics. **[Methods]** First, surface of rice seeds was sterilized by ethanol-sodium hypochlorite, and then the surface sterilized seeds were ground into a powder to isolate endophytic bacteria using the standard dilution plating technique. Second, the strains were purified and 16S rRNA gene sequencing and analyzed. Finally, the isolated strains were tested for plant growth-promoting, such as phosphorus solubilization, indoacetic acid (IAA) and siderophore production, antagonistic and hemolysis. Simple sequence repeats molecular marker technology was used to study the genetic polymorphism in five different genotypes of rice, and some agronomic traits such as tiller numbers, plant height, plant weight and rice production were studied. **[Results]** In total 146 endogenous *Pantoea* strains were isolated from 8 different genotypes of rice seeds. *Pantoea* strains were classed to *Pantoea dispersa*, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea cypripedii* and *Pantoea brenneri* based on 16S rRNA gene phylogenetic analysis. Among the 4 species, *P. dispersa* has the largest size of population and existed in all 8 rice seed samples. Then, 66 strains were selected to test the plant growth-promoting characteristics, 86.3% and 69.7% of the strains were found to have the ability to dissolve phosphorus and produce IAA. 7 strains had the ability to produce siderophore. None of the strains was antagonistic to fungal pathogen *Fusarium moniliforme*. Another 3 strains had hemolytic activity. *Pantoea* composition did not correlate with rice phylogeny and agronomic traits. **[Conclusion]** The species and composition of *Pantoea* were different in different rice seeds. The seeds could selectively accumulated *Pantoea* as endophytic bacteria, and most of the strains had growth-promoting characteristics.

Keywords: *Pantoea*, rice seeds, endophytic bacteria, plant growth-promoting characteristics

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31670005) and by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (Y2019XK07)

*Corresponding author. Tel: +86-10-82105087; E-mail: zhangxiaoxia@caas.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 24 December 2018; Revised: 5 April 2019; Published online: 16 July 2019