

内生放线菌 OsiLf-2 提高水稻耐淹水能力研究

曾镜, 刘赫琴, 熊现秋, 刘鑫, 朱咏华

5 (湖南大学生物学院, 植物功能基因组学与发育调控湖南省重点实验室, 长沙, 410082)

摘要: 淹水直播技术近年来被广泛应用于水稻生产实践当中, 其不仅可以节本增效, 还可以有效控制杂草, 防止鸟类、鼠类咬食。但淹水直播致使种子处于淹水状态, 极易造成烂根、烂芽、烂苗现象出现, 进而引发成苗率低、产量下降等后果, 严重制约了淹水直播技术的应用与发展。本研究发现, 水稻内生放线菌 OsiLf-2 处理能够增强宿主水稻对淹水胁迫的抗性, 提高淹水直播下水稻的成苗率。同时, OsiLf-2 定殖于水稻体内, 与植株稳定共生, 有效提高了淹水植株的芽长、SPAD、株高、根长、地上部及地下部鲜干重等。由此可见, 内生放线菌 OsiLf-2 通过与水稻互利共生提高了水稻的耐淹能力。

关键词: 微生物学; 内生放线菌 OsiLf-2; 水稻直播; 淹水胁迫

15 **中图分类号:** Q939.95

Study on the improvement of rice flooding tolerance by endophytic actinomycete OsiLf-2

Zeng jing, Liu Heqin, Xiong Xianqiu, LIU Xin, ZHU Yonghua

20 (Hunan Province Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Development Regulation, College of Biology, Hunan University, Changsha, 410082)

Abstract: Flooding direct seeding technology has been widely used in rice production practice in recent years, which can not only save costs and increase efficiency, but also effectively control weeds and prevent birds and rodents from biting. However, flooding direct seeding causes seeds to be in a flooded state, which easily causes rotten roots, rotten buds, and rotten seedlings phenomenon, which in turn triggers the consequences of low seedling rate, yield decline, and so on, seriously restricting the application and development of flooding direct seeding technology. In this study, we found that the treatment of rice endophytic actinomycete OsiLf-2 could improve the resistance of rice to flooding stress, thus increasing the seedling success rate of rice under flooded direct seeding. Moreover, OsiLf-2 colonized in rice and stabilized symbiosis with rice plants, effectively increasing shoot length, SPAD, plant height, root length, aboveground and belowground fresh dry weight of flooded plants. Thus, the endophytic actinomycete OsiLf-2 improved the flooding tolerance of rice through mutualistic symbiosis with rice.

35 **Key words:** Microbiology; Endophytic actinomycete OsiLf-2; Rice direct seeding; Flooding stress

0 引言

我国超过 60% 的人口以水稻作为主要粮食, 但近年来农村人口大量向城市迁移使劳动力规模大幅度减少, 逐渐无法适应传统农业的发展需求。因此, 传统水稻种植方式逐步被直播水稻取代。淹水直播技术目前在我国长江中下游地区发展迅猛, 它能在省工省时的基础上很好的控制稻田杂草的生长。尽管淹水直播的优势明显, 但仍然存在一定的技术难题。其中之一是淹水胁迫导致水稻萌发缺氧, 虽然水稻可以耐受厌氧萌发, 但缺氧显著降低了种子的

作者简介: 曾镜 (1999 年), 女, 硕士研究生, 植物-微生物互作

通信联系人: 朱咏华 (1968 年), 女, 博导, 植物-微生物互作. E-mail: Yonghuaz@outlook.com

发芽率^[1,2]。因此,提高水稻苗期耐淹能力可以为解决淹水直播水稻幼苗面临的困境提供参考。

45 植物内生菌(Plant endophyte)是生存在植物组织中的微生物,在其生命周期内不会对宿主植物造成不利影响^[3]。近年来大量的研究表明,内生菌不仅能促进植物生长发育^[4],还能在植物抵抗生物和非生物胁迫过程中发挥重要作用。目前研究证实内生菌可以通过减少脂质过氧化物的积累^[5]、分泌植物激素等代谢物质^[6]和控制基因表达^[7]等途径来缓解植物所受的非生物胁迫。

50 淹水胁迫属于非生物胁迫的一种,会给植物造成不可逆转的损伤,导致生长和代谢受到抑制,生长缓慢,甚至死亡^[8]。目前有关内生菌提高水稻耐淹能力的研究还未被报道。产水链霉菌 *Streptomyces albidoflavus* OsiLf-2 为课题组前期从水稻根部分离筛选获得的一株内生放线菌。前期实验室研究证明 OsiLf-2 具有提高植物抗稻瘟病菌^[9-11]、抗旱及耐盐^[12]的能力,但其对淹水胁迫的响应尚不明确,因此本研究对 OsiLf-2 诱导宿主产生淹水胁迫抗性进行初步探索。

55

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株材料:水稻内生放线菌 *Streptomyces albidoflavus* OsiLf-2 (GeneBank 登录号: NZ_MNPQ0000000.1),中国普通微生物菌种保藏管理中心保藏号:(CGMCC No. 11673),
60 分离自水稻根部,以下简称 OsiLf-2。

植物材料:籼稻 93-11 及隆科早 1 号,种子来源于湖南亚华种业科学研究院。

1.2 菌株培养条件及菌液制备

使用灭菌后的木棒或接种环轻轻刮取成熟的 OsiLf-2 (黄白色)孢子接种于 PDA 培养基中培养。培养条件为 30°C 黑暗倒置培养。待孢子成熟后用棉签轻刮蘸水后获得孢子悬浮液,
65 使用血球计数板制成相应浓度备用。

1.3 水稻种子消毒方法

将挑选后的水稻种子置于灭菌后的培养皿内(以下操作均在灭菌后的超净工作台内进行),加入 75%乙醇消毒 30 秒,倒去后加入 30%次氯酸钠黑暗浸泡 30 分钟,使用无菌水冲洗浸泡后的水稻种子至没有次氯酸钠气味,再次使用无菌水浸泡 10 分钟,倒干净皿中残留
70 水分后在超净工作台中过夜吹干。

1.4 OsiLf-2 包埋水稻种子方法

将消毒后吹干的水稻种子平均分为两份(对照组 CK、处理组 OsiLf-2),使用制备好的 OsiLf-2 孢子悬浮液与黄原胶(100 mL 去离子水+0.3 g 黄原胶,灭菌两次)充分混合,将混合液包覆于水稻种子表面(水稻种子:孢子悬浮液:黄原胶=1 g: 51 μ L: 463 μ L),对照组
75 CK 使用无菌水进行包埋(水稻种子:无菌水:黄原胶=1 g: 51 μ L: 463 μ L)。在超净工作台上吹干后加入适量无菌水,28°C 黑暗条件下催芽。

1.5 水稻培养及淹水处理、取样测定

1) 水培: 将催芽露白的水稻种子置于 50 mL 离心管中, 立即淹水处理, 淹水深度 5 cm, 每个处理 10 颗, 每组三个平行。在水稻培养箱中模拟温室气候, 30 °C光照 14 小时, 25°C 80 黑暗 10 小时, 湿度 70%, 光照强度设置为 800 μmol/(m² s)。测量 1-4 天淹水幼苗胚芽鞘长度。

2) 土培: 将催芽露白的水稻种子种植在灭菌两次的土壤(湘江土: 营养土=2: 1)中, 每个处理 35 颗, 每组三个平行, 1 天后淹水处理, 淹水深度 5 cm, 水稻培养箱条件同上。从第一颗幼苗长出水面开始每天统计不同处理组淹水后水稻出苗数至 14 天; 21 天测量淹水 85 植株的 SPAD、株高、根长、地上部及地下部鲜干重等指标。

3) 田间培养(淹水直播): 种植试验田位于湖南省长沙市宁乡市金洲镇金朱公路隆平高科长沙关山研发基地(北纬 N: 28 °19'20.46", 东经 E: 112 °40'31.83"), 试验田设置每个处理组(CK、OsiLf-2)三组平行, 每组重复内 200 颗水稻种子, 自然条件 5 月播种, 2 天后淹水, 14 天后排水, 6 月初统计淹水直播成苗率。

1.6 DNA 提取及 qRT-PCR 分析

收集不同时间点植物组织样品 0.05 g, 使用 Ezup 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒(EZ-10 Spin Column Plant Genomic DNA Purification Kit, CAS: B518261-0050)提取水稻样品的 DNA。以内生放线菌 OsiLf-2 的保守基因 *RpoA* (α-subunit of RNA polymerase) 拷贝数代表菌体的生物量, 水稻基因 *OsUbq* (a rice genomic ubiquitin DNA) 为内参基因, 通过 qRT-PCR 95 (Quantitative Real-time PCR) 对 OsiLf-2 在水稻中定殖的相对数量变化进行分析, 以确定 OsiLf-2 在淹水水稻中的定殖情况。引物序列见表 1。

表 1 本研究 qRT-PCR 所用引物
Tab. 1 The primers used for qRT-PCR

基因 Gene	引物序列 (5'-3')
<i>OsUbq</i> -F	TTCTGGTCCTTCCACTTTCAG
<i>OsUbq</i> -R	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA
<i>RpoA</i> -F	GTCTCCGCCGTCCAGAACAA
<i>RpoA</i> -R	ACCGAACAGCTCGACCAGGG

100 qRT-PCR 检测使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 反应的专用预混料) 进行, 反应体系如表 2 所示:

105

表 2 qRT-PCR 反应体系
Tab. 2 qRT-PCR reaction system

试剂	体积 (μL)
2 × ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	5
引物 (F)	0.3
引物 (R)	0.3
ddH ₂ O	2.4
DNA 模板 (5 x)	2

110

反应程序设定如表 3 所示:

表 3 qRT-PCR 反应程序
Tab. 3 qRT-PCR reaction program

步骤名称	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 s	1
循环反应	95°C	5 s	40
	60°C	20 s	
	95°C	15 s	
溶解曲线	60°C	60 s	1
	95°C	15 s	

115

2 结果与讨论

2.1 OsiLf-2 包埋水稻最佳浓度筛选

使用不同浓度 (10^6 、 10^7 和 10^8 CFU/mL) 的 OsiLf-2 孢子悬浮液包埋水稻种子, 探究内生菌 OsiLf-2 不同包埋浓度对淹水水稻种子生长的影响。如图 1 A 所示, 使用浓度为 10^7 的 OsiLf-2 孢子悬浮液包埋时, 水稻胚芽鞘长势显著高于浓度为 10^6 、 10^8 CFU/mL 处理组及 CK。1-4 天的胚芽鞘长度统计结果发现 OsiLf-2 包埋浓度为 10^7 CFU/mL 时, 胚芽鞘长度显著高于其它处理组 (图 1 B)。而使用浓度为 10^6 CFU/mL 或 10^8 CFU/mL OsiLf-2 包埋水稻种子时, 结果显示淹水水稻的胚芽鞘长度与 CK 处理组之间的差异性不大, 上述结果表明内生菌 OsiLf-2 对水稻胚芽鞘长度的影响与包埋浓度密切相关, 太高或太低的包埋浓度都会对水稻的生长产生一定的影响, 只有使用合适的浓度处理水稻种子, 才能发挥出最佳的作用。所以, 确定 10^7 CFU/mL OsiLf-2 包埋水稻种子对水稻胚芽鞘在淹水下生长效果最佳。

120

125

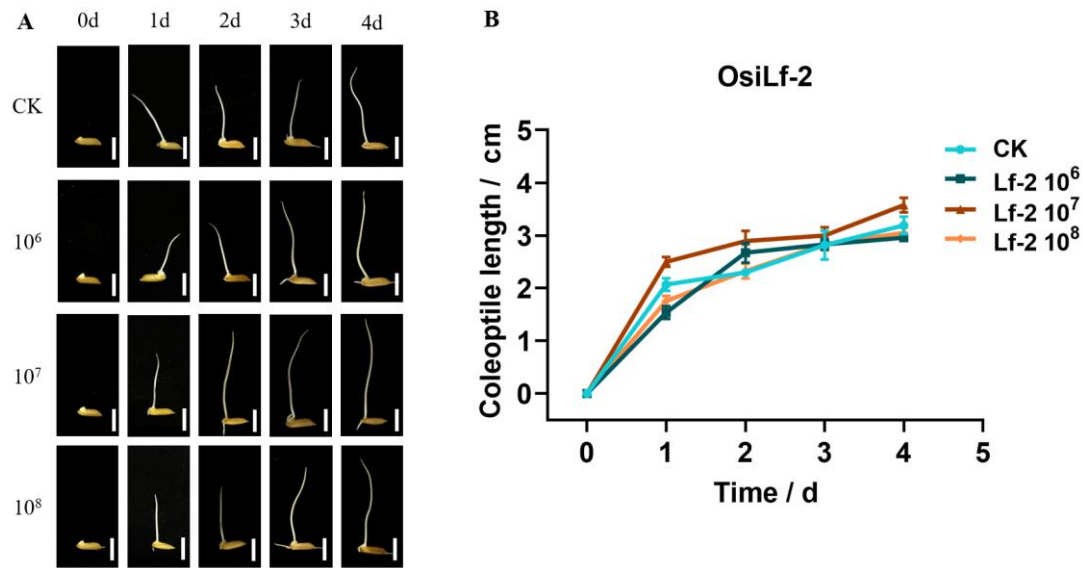


图 1 不同浓度 OsiLf-2 对淹水水稻胚芽鞘长度的影响

(A) 不同浓度 OsiLf-2 包埋后水稻胚芽鞘形态，比例尺为 1 cm；(B) 不同浓度 OsiLf-2 包埋后水稻胚芽鞘长度统计。

130

Fig. 1 Effect of different concentrations of OsiLf-2 on the length of embryo sheath in flooded rice

(A) Morphology of rice blast sheaths after OsiLf-2 embedding at different concentrations, with a scale bar of 1 cm;

(B) Statistics on the length of rice blast sheaths after OsiLf-2 embedding at different concentrations.

2.2 土培淹水水稻成苗率动态分析

135

为了探究 OsiLf-2 处理对淹水水稻成苗率的影响，我们使用浓度为 10⁷ CFU/mL OsiLf-2 孢子液包埋水稻种子，分析对照组 CK 与 OsiLf-2 处理后淹水水稻的成苗情况。结果如图 2 A 所示，OsiLf-2 处理组与对照组 CK 在第四天时幼苗均开始突破水面，而 OsiLf-2 处理组的幼苗出水数量高于对照组 CK，在 4-8 天之间，OsiLf-2 的出水幼苗数一直高于对照组 CK，

140

说明内生菌 OsiLf-2 包埋的水稻可促进水稻幼苗在淹水环境中的生长。从第 10 天开始，发现 OsiLf-2 处理后的水稻幼苗出水数量逐渐高于对照组，说明在淹水胁迫的后期 OsiLf-2 发挥了重要的作用来帮助水稻抵御淹水。实验室前期的研究表明，OsiLf-2 是一株高产生生长素

145

(吲哚-3-乙酸, Indole-3-acetic acid, IAA) 的菌株，而相关研究证实了 IAA 可以显著提升淹水水稻胚芽鞘长度^[13-15]，因此，我们推测 OsiLf-2 可能通过分泌 IAA 来促进淹水下幼苗的伸长，从而快速突破水面获取生长生存所必须的氧气。21 天时 OsiLf-2 处理组 (图 2 B) 的生长情况明显优于 CK，成苗率较对照组 CK 提高了 14.29% (表 4)，上述结果说明 OsiLf-2 可能通过分泌 IAA 来促进淹水水稻的伸长及生长，进一步提高了淹水水稻的成苗率，增强了水稻植株对淹水胁迫的抗性。

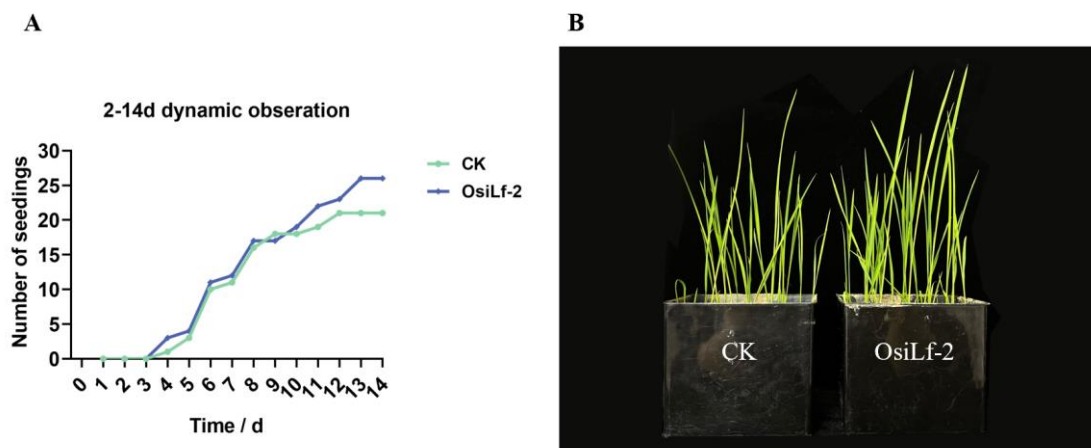


图 2 OsiLf-2 对淹水水稻成苗的影响

150 (A) OsiLf-2 处理后淹水水稻出苗数动态统计; (B) OsiLf-2 处理后淹水水稻 21d 生长情况。

Fig. 2 Effect of OsiLf-2 on seedling establishment in flooded rice

(A) Statistics on the dynamics of seedling emergence number in flooded rice after OsiLf-2 treatment; (B) Growth of flooded rice for 21 d after OsiLf-2 treatment.

155 表 4 不同处理组淹水水稻成苗率
Tab. 4 Flooded rice seedling success

处理组	成苗率
CK	60%
OsiLf-2	74.29%

2.3 土培淹水水稻植株叶绿素含量 (SPAD)、株高、根长及地上部地下部鲜干重分析

160 为了进一步探究 OsiLf-2 处理后对淹水水稻的影响, 我们测量并分析了 21 天时淹水水稻的叶绿素含量 (SPAD)、株高、根长及地上部地下部鲜干重等生长指标。结果显示 (图 3 A-G), OsiLf-2 处理后淹水水稻的叶绿素含量 (SPAD)、株高、根长、地上部鲜重、地上部干重、地下部鲜重和地下部干重分别提升了 3.69%、6.01%、6.63%、5.27%、7.96%、10.14% 和 0.59%, 其中 OsiLf-2 处理后的水稻较对照组相比, 其 SPAD、株高、地上部鲜重及地下部鲜重显著提升。以上结果说明 OsiLf-2 包埋的水稻可促进淹水水稻的光合作用, 并
165 可以提高水稻叶片叶绿素含量, 同时可促进植株伸长并提高淹水植株的株高。另外, OsiLf-2 处理后的水稻植株对照组相比, 其地上部和地下部鲜重都显著升高 (图 3 D、F), 说明内生菌 OsiLf-2 与宿主植物形成互利共生关系提高水稻营养吸收和利用的能力, 从而促进植株的生长发育。而 OsiLf-2 处理对淹水水稻的根长没有显著的促进效果, 可能是在淹水情况下,

170 水稻致力于发育地上部分，促使植株迅速长出水面，体内储存的营养不足以发育地下部分。所以，OsiLf-2 在温室环境下对淹水水稻植株的各项生长指标均有一定程度的提升作用，通过上述结果表明内生菌 OsiLf-2 可提高水稻耐淹水的能力。

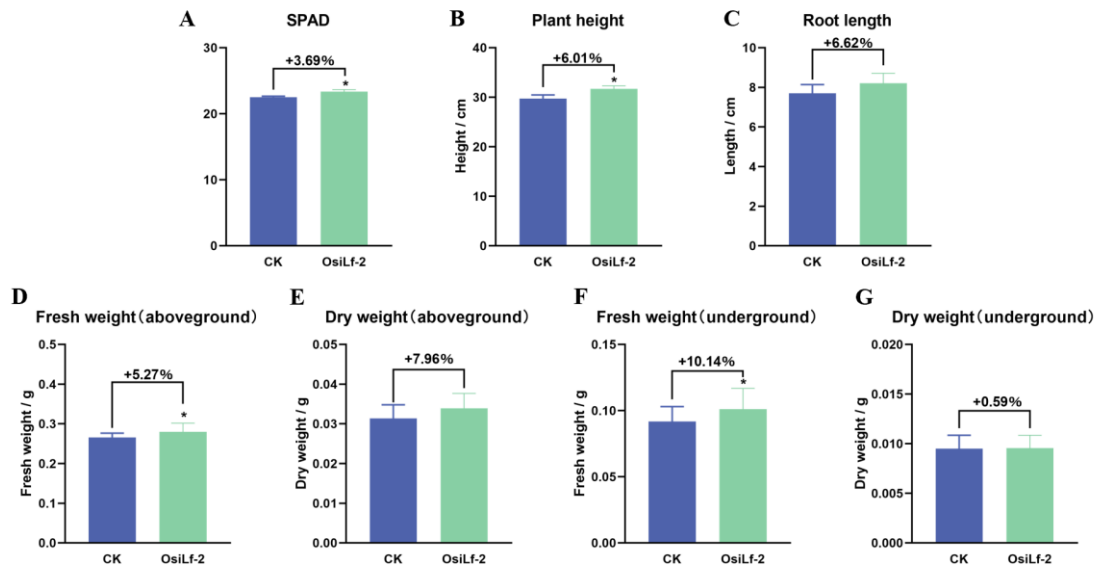


图 3 OsiLf-2 处理后淹水 21 d 水稻各项生长指标

175 (A) SPAD (叶绿素) 含量; (B) 株高; (C) 根长; (D) 地上部鲜重; (E) 地上部干重; (F) 地下部鲜重; (G) 地下部干重。

Fig. 3 Growth indexes of rice flooded for 21d after OsiLf-2 treatment

(A) SPAD; (B) Plant height; (C) Root length; (D) Aboveground fresh weight; (E) Aboveground dry weight; (F) Underground fresh weight; (G) Underground dry weight.

180 **2.4 OsiLf-2 在水稻幼苗中的定殖分析**

上述结果已确认内生菌 OsiLf-2 可提高水稻耐淹的能力，接下来我们对其在淹水水稻中的定殖情况进行了检测和分析。结果如图 4 所示，24 h 时 OsiLf-2 在淹水水稻中有了初始定殖，通过一段时间 OsiLf-2 克服了植物自身防御及淹水胁迫的干扰，于 72 h 时成功与淹水水稻植株共生。这一结果与上述研究相符（图 2 A），OsiLf-2 在 72 h 时稳定定殖于水稻体内，促进了 4 天时淹水水稻幼苗的出水，此时 OsiLf-2 与宿主水稻结合形成互惠互利的共生体系，帮助水稻幼苗快速突破水面来抵御外界的逆境胁迫。由此可见，OsiLf-2 可以稳定定殖于淹水水稻体内，与宿主互惠共生提高水稻的耐淹能力。

185

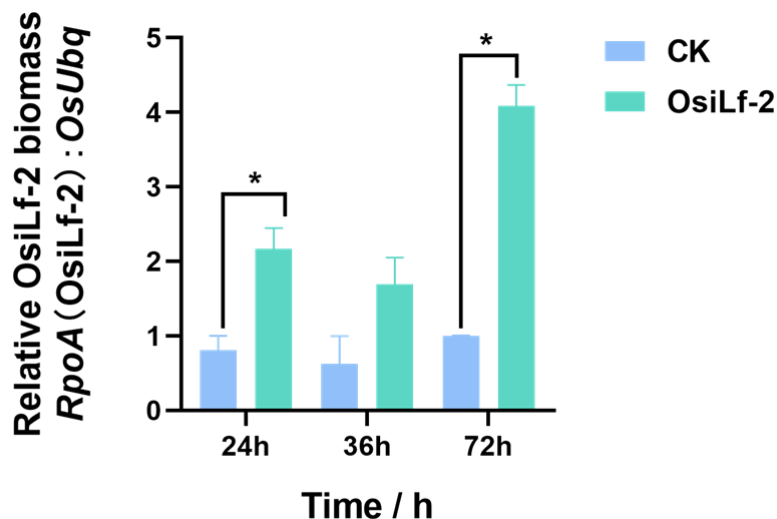


图 4 OsiLf-2 在淹水水稻幼苗中的定殖情况

Fig. 4 OsiLf-2 colonization in flooded rice

190

2.5 田间水稻淹水直播成苗率分析

在确定温室条件下 OsiLf-2 可以提高水稻的耐淹能力之后，我们又继续探究了 OsiLf-2 处理对田间淹水直播成苗率的影响。结果如图 5 所示，在淹水条件下，OsiLf-2 处理后的水稻较对照组相比，其水稻植株存活数量较多，长势较好，根茎粗壮，叶片宽且绿；而对照组 CK 植株瘦弱，叶片窄小且偏黄，说明 OsiLf-2 处理有利于淹水直播条件下植株的生长发育，可以提高水稻的光合作用，促进水稻营养吸收。在淹水条件下，对其成苗率进行统计发现，OsiLf-2 处理组成苗率较对照组 CK 相比提高了 6.16%（表 5），说明 OsiLf-2 不仅可以在温室条件下提高水稻的耐淹能力，还可以在实际生产中提高水稻淹水直播的成苗率。综合上述结果表明，OsiLf-2 可定殖于水稻体内并与宿主水稻形成互利互惠的共生体系，从而可提高水稻生殖生长时期的耐淹水胁迫能力，并为后续稳定水稻产量提供保障。

195

200



图 5 田间淹水直播水稻成苗情况

Fig. 5 Seedling establishment of flooded direct seeded rice in the field

205

表 5 田间淹水直播水稻成苗率

Tab. 5 Seedling success of field flooded direct seeded rice

处理组	成苗率
CK	18.17%
OsiLf-2	24.33%

3 结论

210

植物与内生菌在长期协同进化的过程中形成了相互依存的共生体,内生菌可以协助宿主抵御非生物和生物胁迫。然而,目前关于内生菌提高水稻耐淹水胁迫能力的研究还未有过报道。

215

本研究以水稻内生放线菌 OsiLf-2 为研究对象,研究结果显示,在淹水条件下,OsiLf-2 最适的孢子液浓度为 10^7 CFU/mL,进一步研究结果显示,OsiLf-2 对淹水水稻的胚芽鞘伸长具有较强的促进作用,同时,OsiLf-2 可定殖于水稻体内并于水稻形成共生体,在淹水条件下,可提高淹水水稻的 SPAD、株高、根长、地上部及地下部鲜干重,说明内生菌 OsiLf-2 能够有效提高水稻耐淹能力,帮助植株抵御逆境胁迫。另外,OsiLf-2 对水稻田间淹水直播成苗率有一定程度的提升,说明内生菌 OsiLf-2 在直播水稻的实际生产中具有较好的应用前景,本研究为后续淹水直播技术的大规模应用和发展提供了强有力的参考。

220

[参考文献] (References)

225

[1] 郝红威. 耐淹水稻种质资源的利用及淹水对水稻碳水化合物积累和转化的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.

[2] 刘佳欣, 吴周周, 周婵婵, 等. 水稻倒伏性状与抗倒途径研究进展 [J]. 中国稻米, 2023, 29(06): 44-48.

[3] Compant S, Cambon MC, Vacher C, Mitter B, Samad A, Sessitsch A. The plant endosphere world-bacterial life within plants [J]. Environ Microbiol. 2021, 23(4): 1812-1829.

[4] Vyas P, Kaur R. Plant growth-promoting and antagonistic endophytic bacteria from the medicinal plant *Tinospora cordifolia* stem [J]. 2017, 8(2): 189-193.

230

[5] Miranda V, Silva-Castro GA, Ruiz-Lozano JM, Fracchia S, Garc ía-Romera I. Fungal Endophytes Enhance Wheat and Tomato Drought Tolerance in Terms of Plant Growth and Biochemical Parameters [J]. J Fungi (Basel). 2023, 9(3): 384.

[6] Gul Jan F, Hamayun M, Hussain A, Jan G, Iqbal A, Khan A, Lee IJ. An endophytic isolate of the fungus *Yarrowia lipolytica* produces metabolites that ameliorate the negative impact of salt stress on the physiology of maize [J]. BMC Microbiol. 2019, 19(1): 3.

235

[7] Li D, Bodjrenou DM, Zhang S, et al. The Endophytic Fungus *Piriformospora indica* Reprograms Banana to Cold Resistance [J]. Int J Mol Sci. 2021,22(9): 4973.

[8] Tian Bao-Yu, Cao Yi,Zhang Ke-Qin. Metagenomic insights into communities, functions of endophytes, and their associates with infection by root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in tomato roots [J]. Scientific reports, 2015, 5: 17087.

240

[9] 曾夏冬. 水稻内生放线菌 OsiLf-2 的分离、鉴定及其抗稻瘟病研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2016.

[10] 高艳. 水稻内生放线菌 OsiSh-2 和 OsiLf-2 的抗病促生特性及作用机制分析 [D].长沙: 湖南大学, 2020.

[11] Gao Y, Zeng X D, Ren, B. et al. Antagonistic activity against rice blast disease and elicitation of host-defence response capability of an endophytic *Streptomyces albidoflavus* OsiLf-2 [J].Plant Pathology, 2020, 69(2).

- 245 [12] Niu S , Gao Y , Zi H ,et al.The osmolyte-producing endophyte *Streptomyces albidoflavus* OsiLf-2 induces drought and salt tolerance in rice via a multi-level mechanism [J].*The Crop Journal*, 2022, 10(2): 375-386.
- [13] Yu Sian Wu, Chin Ying Yang. Comprehensive Transcriptomic Analysis of Auxin Responses in Submerged Rice Coleoptile Growth [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(4): 1292.
- [14] Nghi K N , Tondelli A ,Valè Giampiero, et al. Dissection of coleoptile elongation in japonica rice under submergence through integrated genome wide association mapping and transcriptional analyses [J].*Plant Cell & Environment*, 2019, 42: 1832-1846.
- 250 [15] Nghi K N, Tagliani A, Mariotti L, et al. Auxin is required for the long coleoptile trait in japonica rice under submergence [J].*The New phytologist*, 2021, 229(1): 85-93.