

# 小粒野生稻内生细菌的分离鉴定和促生功能分析

杨立凡<sup>#</sup> 田青霖<sup>#</sup> 龚禹瑞 李臻园 李庆懋 李沁妍 黄立钰 胡凤益 秦世雯<sup>\*</sup>

(云南大学 农学院/农业农村部多年生稻生物学与种质创新重点实验室, 昆明 650091; <sup>#</sup> 共同第一作者;

<sup>\*</sup> 通讯作者: shiwenqin@ynu.edu.cn)

**摘要:**小粒野生稻(*Oryza minuta*)是具有良好生物和非生物胁迫抗性的野生稻资源,挖掘小粒野生稻促生相关内生细菌可为其微生态研究和菌肥开发提供参考信息。本研究对小粒野生稻的根、茎和叶进行内生细菌分离,共获得 85 个菌株。通过促生功能分析发现,43 株内生细菌具有溶磷能力,19 株具有固氮作用,29 株产铁载体,13 株产吲哚乙酸。分离自根部的 OMR2-3 菌株和叶部的 OML3-4 菌株具有较高吲哚乙酸分泌能力,分别为 17.22 mg/L 和 16.59 mg/L。形态学和分子鉴定显示,OMR2-3 菌株和 OML3-4 菌株分别为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)和路德维希肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*)。通过温室促生效果测定发现,2 个菌株对多年生稻粳型品种 PR23 和籼型品种云大 107 具有显著促生效果,可以不同程度促进多年生稻幼苗的株高、根长、鲜质量、叶绿素和氮素含量。以上结果说明,小粒野生稻蕴含丰富的促生相关内生细菌资源,从中筛选到的内生阴沟肠杆菌 OMR2-3 菌株和路德维希肠杆菌 OML3-4 菌株具有开发成为多年生稻生物微生物菌肥的潜力,有助于多年生稻绿色轻简化的生产模式。

**关键词:**小粒野生稻;内生细菌;促生作用;微生物菌肥;多年生稻

**中图分类号:**S476.1;S511 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-8082(2023)04-0078-06

小粒野生稻(*Oryza minuta*)是四倍体(BBCC 基因组)、多年生的野生稻种质资源,适应性强且具有良好的稻瘟病、白叶枯病、纹枯病和稻飞虱抗性<sup>[1]</sup>。目前,研究人员已从小粒野生稻中挖掘出多个可用于栽培稻遗传改良的抗性、产量和品质相关优异基因<sup>[2]</sup>。研究还发现,小粒野生稻比栽培稻具有更为丰富的内生细菌多样性<sup>[3]</sup>。说明小粒野生稻的遗传基础和微生态对其环境和胁迫适应性起到重要作用。

植物内生菌是一类定殖于植物体内的微生物资源,对植物的生长发育具有重要影响<sup>[4]</sup>。植物内生细菌通过固氮、溶磷、解钾、分泌植物生长激素、铁载体、ACC 脱氨酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase)、抗生素或激发子等来提高植物营养吸收、促进生长、抑制病原菌和诱导植物系统性抗性<sup>[5-9]</sup>。此外,研究表明,将干旱、寒冷、高温、盐碱和污染等环境下生长的植物进行内生细菌分离,回接到寄主或非寄主植物中,可以显著提高植物在逆境条件下的生长<sup>[10-14]</sup>。因此,植物内生细菌在植物保护、绿色可持续农业发展、生态环境修复等领域具有重要的研究意义和应用开发前景。内生细菌作为小粒野生稻微生态系统的重要组成部分,对其挖掘和功能研究尚少。

多年生稻是种植一次可以连续收获多年(季)的新型稻作品种<sup>[15]</sup>。相对于一年生水稻,多年生稻从第 2 季起,在稻作生产过程中不再需要买种、育秧、犁田、耙田、移栽等生产环节,而只需要田间管理和收获 2 个生产环节,节约了人工投入、降低了劳动强度。多年生稻

进行连续生产需采取合适的施肥手段才能保证良好的土壤结构以保障其生长发育。绿色、友好、无残留的微生物菌肥可满足多年生稻绿色轻简化的生产模式,提高多年生稻抗病虫能力、避免土壤结构恶化和环境污染。因此,本研究分离小粒野生稻的内生细菌,挖掘具有对多年生稻促生能力的细菌资源,为小粒野生稻微生态功能研究和多年生稻微生物菌肥开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

小粒野生稻(*Oryza minuta*)、多年生稻籼稻品种云大 107 和粳稻品种 PR23 均由农业农村部多年生稻生物学与种质创新重点实验室提供。

### 1.2 内生细菌的分离纯化

分别剪取小粒野生稻健康的根、茎和叶组织,无菌水冲洗表面污渍。组织表面消毒采用 75%酒精浸泡 2~5 min,无菌水漂洗 1 次,2.5%次氯酸钠浸泡 2~4 min,无菌水漂洗 3 次。组织研磨后,将研磨液进行梯度稀释( $10^{-2}$ ~ $10^{-5}$ ),取 100  $\mu$ L 稀释液涂布于 NA 培养基<sup>[16]</sup>。吸取第 3 次漂洗液涂布至 NA 培养基,用来检测组织表面消毒是否彻底。28  $^{\circ}$ C 黑暗倒置培养 1~3 d,待细菌菌

收稿日期:2023-02-17

**基金项目:** 云南省基础研究计划重点项目(202101AS070001); 云南省基础研究计划面上项目(202101AT070021)

落长出,挑取形态不同的细菌菌落进行纯化和保存。

### 1.3 内生菌促生功能测定

#### 1.3.1 溶磷能力测定

在无机磷培养基<sup>[17]</sup>和有机磷培养基<sup>[18]</sup>上放置灭菌滤纸片,每个滤纸片上接种 5  $\mu$ L 菌液( $OD_{600\text{nm}}=1.0$ ),以接种 5  $\mu$ L 的 NB 培养液作为对照,28  $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 2~3 d 后观察是否形成透明圈。根据透明圈直径和菌落圈直径的比值( $m_p$  值)评估菌株的溶磷能力。

#### 1.3.2 固氮作用检测

采取划线法,在 Ashby 培养基<sup>[19]</sup>上接种内生细菌,以 NB 培养液作为对照,28  $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 2~3 d,将能够稳定生长的菌株视为固氮菌。利用引物 ZehrF (5'-TGYGAYCCNAARGCNGA-3') 和 ZehrR (5'-NDGC-CATCATYTCNCC-3') 对菌株的固氮酶基因 *nifH* 进行 PCR 扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后测序。

#### 1.3.3 产铁载体能力测定

在铬天青(CAS)培养基<sup>[20]</sup>上放置灭菌滤纸片,每个滤纸片上接种 5  $\mu$ L 菌液( $OD_{600\text{nm}}=1.0$ ),以接种 5  $\mu$ L 的 NB 培养液作为对照,28  $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 2~3 d 后观察是否有橙黄色变色圈,根据变色圈直径和菌落圈直径的比值( $m_p$  值)评估菌株的产铁载体能力。

#### 1.3.4 产吲哚乙酸能力测定

定性分析采用比色法<sup>[21]</sup>,将菌株接种至 King B 培养基<sup>[22]</sup>中,28  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 振荡培养 2 d。吸取等体积菌悬液和 Salkowski's 试剂<sup>[23]</sup>于白色点滴板上,阳性对照为 50 mg/L 吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA),阴性对照为 King B 培养基。避光 30 min 后观察其颜色变化,呈现粉红色说明菌株能产生 IAA。

IAA 定量测定:配制浓度为 10~60 mg/L 的 IAA 标准品溶液,分别与 Salkowski's 试剂等体积混合,25  $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 30 min,测定  $OD_{530\text{nm}}$  值,绘制标准曲线。将上述定性测定中具有产 IAA 功能的菌株接种于 King B 培养基中,设置 3 个重复,37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 48 h 后,10 000 r/min 离心。取上清液与 Salkowski's 显色剂等体积混合,25  $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 30 min,测定  $OD_{530\text{nm}}$  值。King B 培养基与 Salkowski's 试剂等体积混合为空白对照。根据 IAA 标准曲线方程  $y=0.0195x-0.0129$ ,  $R^2=0.9953$  计算菌株的 IAA 产量。

### 1.4 菌株的形态学观察和分子鉴定

将菌株在 NA 平板上 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后观察单菌落形态特征。菌株在 NB 培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm 振荡培养 16~24 h 后进行革兰氏染色和菌体形态特征观察。利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA 后,进行 16S rRNA 序列(引物序列为:5'-A-

GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 5'-GGTACCTTGT-TACGACTT-3') 和 *gyrB* 基因(引物序列为 5'-GAAGT-CATCATGACCGTTCTGCA-3' 和 5'-AGCAGGGTACG-GATGTGCGAGCC-3') 的 PCR 扩增。PCR 产物测序后在 NCBI 数据库进行 Blastn 比对。利用 MEGA 11 软件的最大似然法(Maximum Likelihood),与 NCBI 中相似性高的菌株构建 16S rRNA 与 *gyrB* 串联拼接序列的系统发育树,Bootstrap 值为 1000。

### 1.5 促生效果测定

选取健康一致的多年生稻品种 PR23 和云大 107 种子,用 75%酒精洗 2 次,每次 5 min,15%次氯酸钠洗 3 次,每次 8 min 进行消毒。浸种处理:10<sup>8</sup> cfu/mL 的菌株悬液浸泡种子 12 h,对照以无菌水进行浸泡,然后催芽至露白,随后播种于苗盘中,每穴 9 粒种子,每个处理 3 个重复。拌土处理:将 30 mL 10<sup>8</sup> cfu/mL 的菌株悬液与 500 g 灭菌土中混合均匀,放置于苗盆中,将催芽至露白的种子播种于苗盘中,每穴 9 粒种子,每个处理 3 个重复。待多年生稻长至 4 叶期时测量其株高、根长、鲜质量、叶绿素和氮素含量。

### 1.6 数据处理

利用 SPSS 17 软件对数据进行统计分析,以单因素方差分析和 Duncan's 法检验数据差异显著性,利用 Graphpad Prism 8.0 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 小粒野生稻内生细菌的分离和纯化

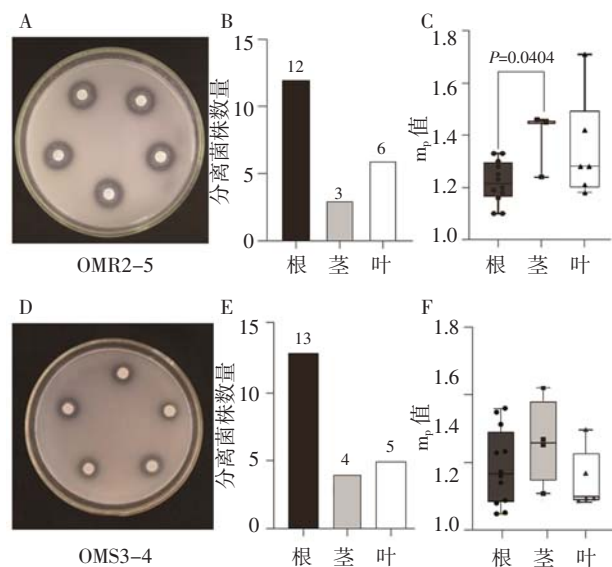
通过组织分离法和菌种纯化,从小粒野生稻的根、茎和叶部中分别获得 40、20 和 25 株内生细菌菌株,共计 85 株。根部分离获得的内生细菌数量多于叶部和根部,这可能是由于土壤根际效应使得根部相较于其他组织内生细菌的种类和数量较多。

### 2.2 内生细菌的溶磷能力

具有溶磷效果的内生细菌可以将无机磷和有机磷培养基中难溶性磷转变为可溶性磷,使得菌落周围出现明显的透明圈(图 1A 和 1D)。本研究获得 21 株具有溶解无机磷能力的细菌菌株, $m_p$  值在 1.10~1.73 范围(图 1B),22 株具有溶解有机磷能力的细菌菌株(图 1E), $m_p$  值在 1.10~2.05 范围。统计分析显示,茎部分离到的内生细菌溶解无机磷能力高于其他组织的内生细菌(图 1C)。

### 2.3 内生细菌的固氮作用

利用 Ashby 固氮培养基对内生细菌进行培养,共有 19 个内生细菌菌株可稳定生长(图 2A 和 2B),说明其具有固氮功能。通过固氮酶基因 *nifH* 的 PCR 扩增和



A, OMR2-5 菌株(溶无机磷能力最强,  $m_p$  值为  $1.73 \pm 0.03$ ) 在无机磷培养基中的溶磷效果; B, 溶无机磷内生细菌数量; C, 溶无机磷功能菌株的  $m_p$  值; D, OMS3-4 菌株(溶有机磷能力最强,  $m_p$  值为  $2.05 \pm 0.05$ ) 在有机磷培养基中的溶磷效果; E, 溶无机磷内生细菌数量; F, 具有溶无机磷功能菌株的  $m_p$  值。

图1 具有溶磷能力的内生细菌数量及其  $m_p$  值

测序分析发现, 其中 15 个菌株具有固氮酶基因 *nifH* (图 2C), 说明这 15 个菌株可以通过 *nifH* 基因进行固氮作用, 而未扩增出 *nifH* 基因的 4 个菌株可能通过其他机制进行固氮。

#### 2.4 内生细菌的产铁载体能力

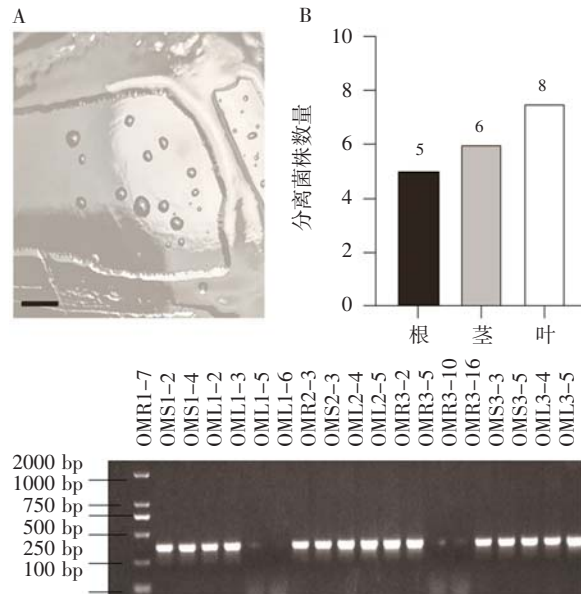
利用蓝色的铬天青培养基(CAS)对内生细菌进行培养, 29 株的内生细菌周围呈现明显的橙黄色变色圈(图 3A 和 3B),  $m_p$  值在 1.09~4.57 范围(图 3C), 说明其具有产铁载体的能力。统计比较显示根、茎和叶部分离的内生细菌的产铁载体  $m_p$  值无显著差异(图 3C)。

#### 2.5 内生细菌产吲哚乙酸能力

利用 IAA 显色反应发现, 共有 13 株内生细菌在 30 min 后使反应液呈现粉红色(图 4 A 和 4 B), 说明其具有产 IAA 功能。通过定量测定, 13 株内生细菌的 I-  
AA 分泌量在 0.12~17.22 mg/L 范围(图 4 C)。其中分离自根部的 OMR2-3 菌株和分离自叶部的 OML3-4 菌株 IAA 分泌量显著高于其他菌株, 分别为 17.22 mg/L 和 16.59 mg/L, 说明其具有较高的 IAA 分泌能力。

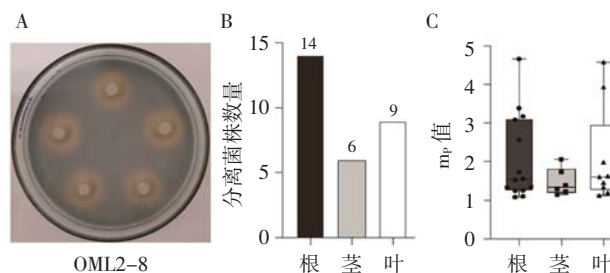
#### 2.6 OMR2-3 和 OML3-4 菌株的鉴定

选取高产 IAA、铁载体和固氮的 OMR2-3 菌株和高产 IAA、溶磷和固氮的 OML3-4 菌株进行形态学和分子鉴定。结果发现, OMR2-3 菌株属于革兰氏阴性细菌, 杆状, 菌体大小为  $(0.8 \sim 1.0) \mu\text{m} \times (2.0 \sim 3.0) \mu\text{m}$  (图 5



A, 具有固氮功能菌株的 OMR2-3 菌株在 Ashby 培养基上 2 d 的形态; B, 具有固氮作用的菌株数量; C, 具有固氮作用的菌株固氮酶基因 *nifH* 的 PCR 产物电泳图。

图2 具有固氮作用的内生细菌数量及其固氮酶基因 *nifH* 的扩增



A, OMR2-8 菌株(产铁载体能力最强,  $m_p$  值为  $4.57 \pm 0.06$ ) 在铬天青培养基中的产铁载体能力; B, 产铁载体菌株的数量; C, 产铁载体菌株的  $m_p$  值。

图3 产铁载体内生细菌的数量及其  $m_p$  值

A); 在 NA 培养基上单菌落为淡黄色, 圆形, 无凸起, 表面光滑, 边缘整齐, 菌落大小为 4~5 mm (图 5 B); OMR2-3 菌株与阴沟肠杆菌 ATCC 13047 菌株的 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列相似性最高, 分别为 98.11% 和 97.26%, 并与阴沟肠杆菌 134B5 菌株同处一个进化分支(图 5 C), 鉴定为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)。OML3-4 菌株属于革兰氏阴性细菌, 杆状, 菌体大小为  $(0.8 \sim 1.0) \mu\text{m} \times (4.0 \sim 5.0) \mu\text{m}$  (图 6 A); 在 NA 培养基上单菌落为乳白色, 圆形, 无凸起, 表面光滑, 边缘整齐, 菌落大小为 2.0~3.0 mm (图 6 B)。OMR3-4 菌株与路德维希杆菌 WAB1946 菌株的 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列相似性最高, 分别为 99.58% 和 98.7%, 并同处于一



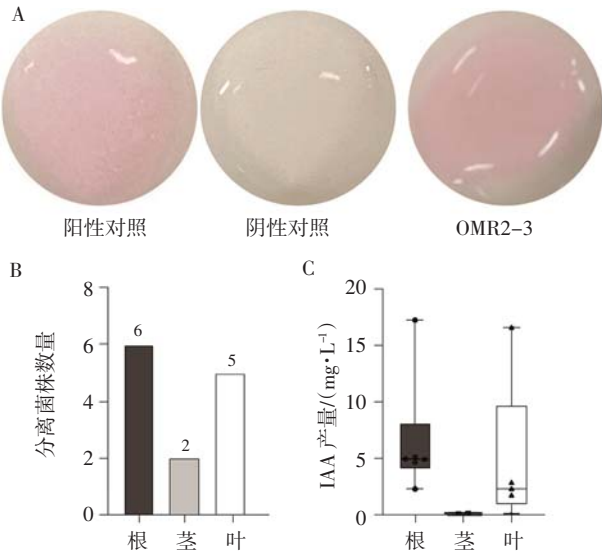


图 4 小粒野生稻中产吲哚乙酸菌株的数量及产量

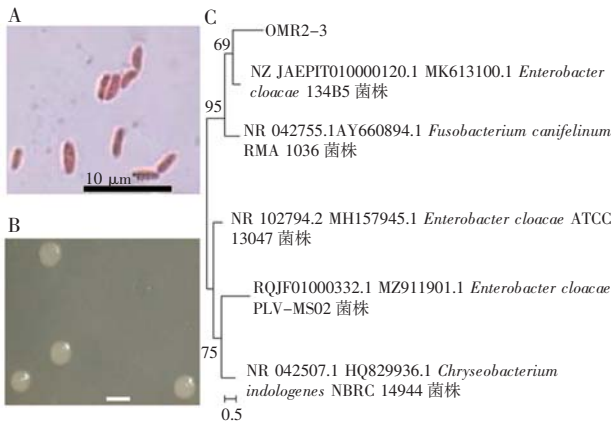


图 5 阴沟肠杆菌 OMR2-3 菌株鉴定及进化系统发育树

个进化分支 (图 6 C), 鉴定为路德维希希肠杆菌 (*Enterobacter ludwigii*)。

## 2.7 OMR2-3 和 OML3-4 菌株对多年生稻的促生效果

进行菌株浸种及拌土处理后, 多年生稻栽种至 4 叶期时发现, OML3-4 和 OMR2-3 菌株对多年生稻梗型品种 PR23 和粳型品种云大 107 均具有促生效果 (图 7)。OMR2-3 菌株浸种处理可显著提高 PR23 的株高、根长、鲜物质量、叶绿素和氮素含量; 而拌土处理对 PR23 无明显促生效果。OML3-4 菌株浸种处理可显著提高 PR23 的根长和叶绿素含量, 拌土处理可显著提高 PR23 株高、根长、鲜物质量、叶绿素和氮素含量 (表 1)。

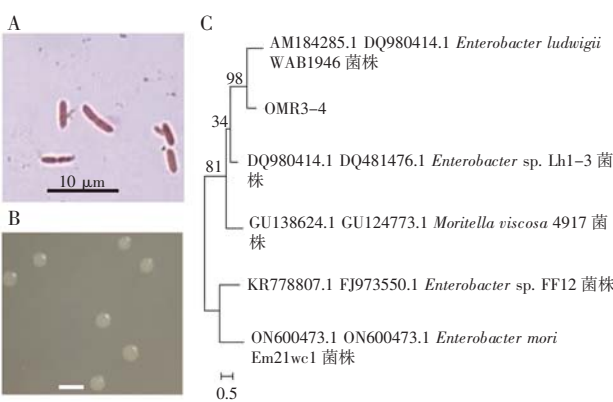


图 6 路德维希希肠杆菌 OML3-4 菌株鉴定及进化系统发育树

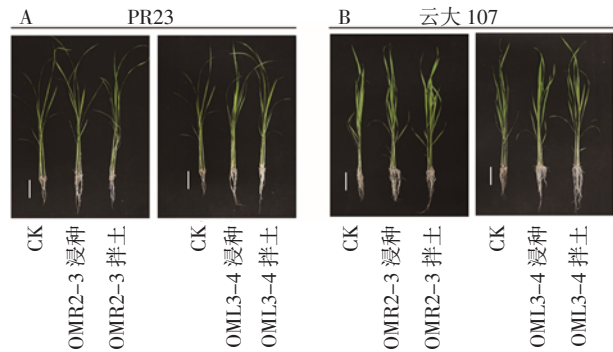


图 7 阴沟肠杆菌 OMR2-3 菌株和路德维希希肠杆菌 OML3-4 菌株对多年生稻的促生效果

OMR2-3 菌株浸种处理可显著提高云大 107 的鲜物质量、叶绿素和氮素含量, 拌土处理可显著提高云大 107 的根长、鲜物质量、叶绿素和氮素含量。OML3-4 菌株浸种和拌土处理均可显著提高云大 107 的根长、鲜物质量、叶绿素和氮素含量 (表 1)。以上结果说明, 阴沟肠杆菌 OMR2-3 菌株和路德维希希肠杆菌 OML3-4 菌株能够促进多年生稻的细胞伸长、光合作用和生物量积累。

## 3 结论与讨论

内生菌是植物微生态的重要组成部分, 遍布在植物组织内, 与宿主形成紧密的互利共生关系。内生菌通过固氮作用、促进有机和无机营养 (磷、铁和钾) 的吸收、产生植物激素 (吲哚乙酸、生长素、赤霉素等) 等机制直接促进寄主的生长<sup>[24-27]</sup>。本研究从小粒野生稻中共筛选到具有溶磷能力内生细菌 43 株, 固氮内生细菌 19 株, 产铁载体内生细菌 29 株, 产 IAA 内生细菌 13

表 1 阴沟肠杆菌 OMR2-3 菌株和路德维希肠杆菌 OML3-4 菌株对多年生稻 PR23 和云大 107 的促生效果

品种	处理	株高/cm	根长/cm	鲜物质量/g	叶绿素含量(SPAD)	氮素含量/(g·kg <sup>-1</sup> )
PR23	CK	32.62±0.66 b	6.70±0.40 b	0.33±0.02 bc	28.08±1.18 b	11.42±0.43 b
	OMR2-3 浸种	40.08±1.28 a	9.16±0.95 a	0.47±0.07 a	30.86±1.54 a	12.44±0.48 a
	OMR2-3 拌土	33.12±3.17 b	7.86±0.25 b	0.34±0.04 c	29.04±0.72 b	11.76±0.47 b
	OML3-4 浸种	35.06±3.33 ab	9.34±0.89 a	0.42±0.07 ab	31.06±1.75 a	12.08±0.74 ab
	OMR3-4 拌土	37.70±2.79 a	9.56±0.69 a	0.50±0.10 a	32.16±1.37 a	12.82±0.43 a
云大 107	CK	32.13±0.78 a	6.55±0.34 b	0.44±0.05 b	28.82±1.86 c	11.72±0.37 c
	OMR2-3 浸种	31.62±0.61 a	7.13±0.43 ab	0.60±0.03 a	33.05±0.71 b	13.17±0.33 a
	OMR2-3 拌土	34.48±3.56 a	11.02±1.74 a	0.56±0.06 a	31.83±1.18 b	12.72±0.37 b
	OML3-4 浸种	35.83±1.58 a	11.15±0.92 a	0.66±0.06 a	34.93±0.63 a	13.72±0.23 a
	OMR3-4 拌土	36.35±0.57 a	11.57±0.87 a	0.60±0.04 a	31.43±1.31 b	12.72±0.48 b

表中数据为“平均值±标准差”;同列数据后不同小写字母表示处理间差异在 0.05 水平显著。OMR2-3 菌株:阴沟肠杆菌;OML3-4 菌株:路德维希肠杆菌。

株,分别占总分离菌株数量的 50.6%、22.3%、34.1%和 15.3%。已有研究从澳洲野生稻<sup>[28]</sup>、尼瓦拉野生稻<sup>[29]</sup>、南方野生稻<sup>[22]</sup>、药用野生稻<sup>[30]</sup>和普通野生稻<sup>[31]</sup>中筛选到具有以上促生功能的内生细菌。说明野生稻蕴含丰富的内生细菌资源,可作为微生物肥料和微生物菌剂开发的重要菌种筛选来源。

野生稻内生细菌能有效定殖于不同栽培稻和多年生稻品种,通过菌株特异性调控机理促进寄主生长。普通野生稻(*O. rufipogon*)内生无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*)具有固氮功能,显著提高籼型水稻华航 1 号株高和鲜物质量<sup>[32]</sup>。药用野生稻(*O. officinalis*)内生细菌克雷伯菌(*Klebsiella variicola*)具有固氮、产 IAA 和铁载体能力,显著提高水稻中嘉早 17 号的分蘖数、株高和叶绿素含量<sup>[33]</sup>。本研究从小粒野生稻中筛选到具有固氮作用、产铁载体和 IAA 的阴沟肠杆菌 OMR2-3 菌株,以及具有溶磷、固氮和产 IAA 的路德维希肠杆菌 OML3-4 菌株,其对多年生稻 PR23 和云大 107 的株高、根长、鲜物质量、叶绿素和氮素含量具有不同程度的促进作用。目前研究还发现,阴沟肠杆菌和路德维希肠杆菌分别对烟草<sup>[34]</sup>和小麦<sup>[35]</sup>也具有促生作用。因此深入研究野生稻内生细菌介导的促生效应,将有助于定向改善水稻对环境的适应性及其生产力,为水稻生物育种及增产提供新途径。

植物种子内生菌群是建立植物内生菌群的基础,种子内生菌群能够随着种子萌发转移至幼苗,促进寄主生长发育<sup>[36]</sup>。本研究采用菌株浸种和拌土方法来构建多年生稻种子内生菌群,结果发现,OMR2-3 菌株拌土处理对多年生稻 PR23 无显著促生作用,可能是由于土壤微生物的稀释效应<sup>[37]</sup>对 OMR2-3 菌株的运动和定殖起到了负面影响。因此,针对不同菌株需采取适宜的接种方法,建立多年生稻生态菌肥的播种和田间管理措施,精准培育“多年生稻-微生物共生体”。本研究仅

进行了 2 株菌株的多年生稻促生效果评价,后续还需挖掘更多的多年生稻促生菌株,深入分析促生菌株的大田长期效应及对农业生态的影响,构建多年生稻“促生微生物组”,助力多年生稻绿色轻简化生产。

参考文献

[1] 钟代彬,罗利军,应存山.野生稻有利基因转移研究进展[J].中国水稻科学,2000,14(2):40-43.

[2] 郭嗣斌,韦宇,李孝琼,等.小粒野生稻优异基因的挖掘与利用研究进展[J].植物遗传资源学报,2016,17(2):371-376.

[3] 毛立晖.野生稻内生细菌群落结构和多样性的研究[D].南昌:南昌大学,2018.

[4] KANDEL S L, JOUBERT P M, DOTY S L. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants [J]. *Microorganisms*, 2017, 5 (4): 77-80.

[5] 杨鸿儒,袁博,赵霞,等.三种荒漠灌木根际可培养固氮细菌类群及其固氮和产铁载体能力[J].微生物学通报,2016,43(11):2366-2373.

[6] VERMA S C, LADHA J K, TRIPATHI A K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of *Endophytic diazotrophs* from deep water rice[J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 91(3): 127-141.

[7] 高增贵,陈捷,刘军华,等.拮抗内生细菌 B20-006 菌株对玉米主要防御酶系的影响[J].植物病理学报,2007,37(1):102-104.

[8] JHA P, KUMAR A. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant [J]. *Microbial Ecology*, 2009, 58(1): 179-188.

[9] KANG S H, CHO H S, CHEONG H, et al. Two bacterial entophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2007, 17(1): 96-98.

[10] CHUNG E J, HOSSAIN M T, KHAN A, et al. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice [J]. *The Plant Pathology Journal*, 2015, 31(2): 152-166.

- [11] PANG Z Q, ZHAO Y, XU P, et al. Microbial diversity of upland rice roots and their influence on rice growth and drought tolerance[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(9): 1 329–1 331.
- [12] ESTRADA G A, BALDANI V L D, OLIVEIRA D M D, et al. Selection of phosphate –solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake[J]. *Plant & Soil*, 2013, 369(2): 115–129.
- [13] 杨亚茹, 茆少星, 闫淑珍, 等. 2 株植物内生菌对油菜和小麦种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 河北农业科学, 2019, 23(6): 31–35.
- [14] 朱华琚, 周瑚, 任佐华, 等. 枯草芽孢杆菌 JN005 胞外抗菌物质及对水稻叶瘟防治效果[J]. 中国水稻科学, 2020, 34(5): 470–478.
- [15] 张石来, 黄光福, 张玉娇, 等. 多年生稻育种进展及展望[J]. 中国稻米, 2022, 28(5): 39–43.
- [16] 邵晨, 黄淑芬, 胡莉, 等. 尼瓦拉野生稻内生菌多样性和促生作用[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(1): 6–9.
- [17] 陈志远, 刘珺, 杨星鹏, 等. 东乡野生稻可培养内生细菌群落组成及多样性[J]. 生物多样性, 2019, 27(12): 1 320–1 329.
- [18] 杜雷, 王素萍, 陈钢, 等. 一株高效解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷能力的研究[J]. 中国土壤与肥料, 2017, 23(3): 136–141.
- [19] 汪蕊露, 李进, 王翀, 等. 一株自生固氮菌的筛选、鉴定及生长条件优化[J]. 生物学杂志, 2022, 39(2): 69–73.
- [20] 于素芳, 丁延芹, 姚良同, 等. 一株花生根际铁载体产生菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(5): 701–703.
- [21] 周铭典, 蔡冠竞, 宁静, 等. 一株产吡啶乙酸菌的筛选、鉴定及培养条件优化[J]. 生物学杂志, 2021, 38(2): 65–69.
- [22] 刘丽辉, 蒋慧敏, 区宇程, 等. 南方野生稻内生细菌的分离鉴定及促生作用[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(5): 1 051–1 058.
- [23] 于素芳, 丁延芹, 姚良同, 等. 一株花生根际铁载体产生菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(5): 701–703.
- [24] 王玉虎, 赵明敏, 郑红丽. 植物内生固氮菌及其固氮机理研究进展[J]. 生物技术进展, 2022, 12(1): 17–26.
- [25] SUZUKI S, HE Y X, OYAIU H. Indole–3–acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch[J]. *Current Microbiology*, 2003, 47(2): 138–143.
- [26] 赵晓妍, 曹越, 董芮萌, 等. 一株野生大豆内生细菌 YDX14 菌株的分离、鉴定及促生效应研究[J]. 大豆科学, 2021, 40(2): 224–231.
- [27] 孙力军, 陆兆新, 刘俊, 等. 一株产胞外多糖植物内生菌 EJS–3 菌株的分离和鉴定[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 65–68.
- [28] 原红娟, 严慧, 杨芳, 等. 澳洲野生稻 (*Oryza australiensis*) 内生固氮菌的分子鉴定及发育分析 [J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(4): 571–577.
- [29] 邵晨, 黄淑芬, 胡莉, 等. 尼瓦拉野生稻内生菌多样性和促生作用[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(1): 33–38.
- [30] 谭泽文, 谭志远, 黄慧灵, 等. 梧县药用野生稻内生固氮菌分离鉴定与系统发育分析[J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23(4): 622–627.
- [31] 张国霞, 茅庆, 何忠义, 等. 陵水普通野生稻 (*Oryza rufipogon*) 内生菌的固氮及溶磷特性 [J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(4): 457–460.
- [32] 谭志远, 彭桂香, 徐培智, 等. 普通野生稻 (*Oryza rufipogon*) 内生固氮菌多样性及高固氮酶活性[J]. 科学通报, 2009, 54(13): 1 885–1 893.
- [33] 阳洁, 秦莹溪, 王晓甜. 广西药用野生稻内生细菌多样性及促生作用[J]. 生态学杂志, 2015, 34(11): 3 094–3 100.
- [34] 刘虎, 易建华, 周东波, 等. 阴沟肠杆菌 JP6 对烟株生长及根际土壤生物学特性的影响 [J]. 山东农业大学学报 (自然科学版), 2018, 49(1): 14–21.
- [35] 蔡高磊, 周场, 赵昌松, 等. 耐重金属肠杆菌 GL–2 鉴定及对小麦促生作用的研究[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(23): 44–48.
- [36] 陈珂璇, 李海燕. 植物种子内生菌及其应用前景的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2021, 40(11): 40–44.
- [37] 席念勋, 张原野, 周淑荣. 群落生态学中的植物–土壤反馈研究[J]. 植物生态学报, 2022, 47(9): 1–13.

## Screening and Identification of Endophytic Bacteria from *Oryza minuta* and Their Plant Growth – promoting Activities

YANG Lifan<sup>#</sup>, TIAN Qinglin<sup>#</sup>, GONG Yurui, LI Zhenyuan, LI Qingmao, LI Qinyan, HUANG Liyu, HU Fengyi, QIN Shiwen<sup>\*</sup>

(Key Laboratory of Biology and Germplasm Innovation of Perennial Rice of Ministry of Agriculture and Rural Affairs/School of Agriculture, Yunnan University, Kunming 650091, China; <sup>#</sup>Co–author; <sup>\*</sup>Corresponding author: shiwenqin@ynu.edu.cn)

**Abstract:** *Oryza minuta* is a valuable wild rice resource that has good biostress and non–biostress resistance. The collection of endophytic bacterial strain resources from *Oryza minuta* could be used for micro–ecosystem research and application in agricultural fertilizer production. In this study, a total of 85 endophytic bacterial strains were isolated, including 43 phosphate –solubilizing bacteria, 19 nitrogen–fixing bacteria, 29 siderophore–producing bacteria and 13 indole–3–acetic acid (IAA)–producing bacteria. Strains OMR2–3 and OML3–4 were identified as *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter ludwigii* based on morphological identification and molecular identification, respectively, showing the highest IAA productivity with yields of 17.22 mg/L and 16.59 mg/L. The greenhouse experiment showed that strains OMR2–3 and OML3–4 significantly promoted perennial rice growth. These results indicated that abundant endophytic bacteria with plant growth – promoting activities live in *Oryza minuta*. *E. cloacae* strain OMR2–3 and *E. ludwigii* strain OML3–4 have great potential to be developed as microbial fertilizers for perennial rice, which will meet the simplified cultivation model of perennial rice.

**Key words:** *Oryza minuta*; endophytic bacteria; plant growth promotion; microbial fertilizers; perennial rice