



水稻种子的细菌含量和群落结构及其影响因素分析

张佳彬^{1,2}, 陈丽莹², 尤茜^{2,3}, 张莉莉^{2*}, 贺学礼^{1*}

1 河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002

2 中国科学院微生物研究所 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101

3 山西农业大学农学院, 山西 晋中 030801

张佳彬, 陈丽莹, 尤茜, 张莉莉, 贺学礼. 水稻种子的细菌含量和群落结构及其影响因素分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4232-4244.

ZHANG Jiabin, CHEN Liying, YOU Qian, ZHANG Lili, HE Xueli. Bacterial abundance and community structure in rice seeds and their influencing factors[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4232-4244.

摘要: 【目的】种子是植物微生物群代际传递的重要途径, 但种子携带的微生物群落尚缺乏系统的研究。本研究以水稻种子为模型, 定量分析种子的细菌含量、测定种子的细菌群落结构、探究地域与品种对细菌含量及群落结构的影响和鉴定水稻种子的核心菌群。【方法】选取 18 个水稻品种, 每个品种分别来自中国海南和天津 2 个地域, 共 36 组样本。每组样本包含 5 或 10 个 DNA 样本, 每个 DNA 样本由 3 粒种子提取的总 DNA 构成。使用细菌特异性 16S rDNA 介导的荧光定量 PCR 技术测定种子的细菌含量, 并分析影响因素; 使用 16S rDNA 扩增子测序技术测定种子的细菌群落结构, 并用生物信息学方法分析了影响因素和核心菌群。【结果】本研究测定了 1 080 粒水稻种子的细菌含量, 发现经过表面除菌的水稻种子内部存在共栖细菌, 平均每克种子的细菌含量为 1.53×10^6 。水稻品种对种子的细菌含量有显著影响, 而地域无影响。测定 180 个扩增子文库的细菌群落结构, 发现水稻种子的菌群与水稻植株有相似之处, 均以变形菌门为主要的细菌门类; 地域对水稻种子的细菌群落结构有重要影响, 不同地域的水稻种子在主坐标分析(principal co-ordinate analysis, PCoA)中有明显分离; 而粳稻和籼稻之间无显著差异。还发现水稻种子存在核心菌群, 且相对丰度高达总菌群的 85.56%。【结论】本研究系统地揭示了水稻种子的细菌含量、群落结构及其影响因素, 为利用种传微生物促进水稻健康提供了数据和方法支持。

关键词: 水稻种子菌群; 群落定量分析; 16S rDNA 二代测序; 种子菌群组成和结构; 核心菌群

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFF1001800)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1001800).

*Corresponding authors. ZHANG Lili, Tel: +86-10-64806916, E-mail: zhangll@im.ac.cn;

HE Xueli, Tel: +86-312-5079364, E-mail: xlh3615@126.com

Received: 2023-03-20; Accepted: 2023-07-13; Published online: 2023-08-04

Bacterial abundance and community structure in rice seeds and their influencing factors

ZHANG Jiabin^{1,2}, CHEN Liying², YOU Qian^{2,3}, ZHANG Lili^{2*}, HE Xueli^{1*}

1 School of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China

2 State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi, China

Abstract: [Objective] Seeds are an important pathway for the intergenerational transmission of plant microbiota, while the systematic research on the microbiota carried by seeds remains to be carried out. In this study, we measured the bacterial abundance, determined the bacterial community structure, explored the effects of planting regions and rice cultivars on bacterial abundance and community structure, and identified the core bacterial taxa in rice seeds. [Methods] We collected 36 groups of samples of 18 rice cultivars, each from Hainan and Tianjin in China. Each group of samples contained 5 or 10 DNA samples, each of which was extracted from 3 seeds. The fluorescent quantitative PCR for bacterial 16S rDNA was employed to measure the bacterial abundance in seeds, and the factors influencing the abundance were explored. The 16S rDNA amplicon sequencing was performed to determine the bacterial community structure in seeds. Furthermore, bioinformatics tools were used to analyze the factors influencing bacterial community structure and the core bacterial taxa. [Results] We measured the bacterial abundance of 1 080 rice seeds and found that endophytic bacteria existed in the rice seeds after surface sterilization, with the average abundance of 1.53×10^6 per gram of seeds. The bacterial abundance in seeds was affected by rice cultivars rather than planting regions. We measured the bacterial community structure of 180 amplicon libraries and found that the bacterial community in rice seeds was similar to that in rice plants, both dominated by *Proteobacteria*. Planting regions significantly affected the bacterial community structure in rice seeds. The rice seeds from different planting regions were clearly separated in principal co-ordinate analysis, while there was no significant difference between japonica and indica. In addition, rice seeds had core bacterial taxa, with the relative abundance up to 85.56%. [Conclusion] This study systematically revealed the bacterial abundance and community structure in rice seeds and their influencing factors, providing data and methods for using seed-borne microorganisms to improve rice health.

Keywords: bacterial community in rice seeds; quantitative analysis of community; 16S rDNA next-generation sequencing; composition and structure of seed microbiota; core bacterial taxa

在自然界中, 植物总是与其共栖微生物以全功能体的形式存在, 在全功能体内, 植物和微生物紧密相互作用, 共同调控植物的生长发

育和各项生理功能^[1], 因此微生物组被称为是高等植物的第二套基因组。植物微生物群的成员有细菌、真菌、古菌、藻类和小型原生生物

等,其中共栖细菌是微生物群的主要组成部分,其在植物生长发育、养分高效利用以及胁迫应对中的重要功能已得到很好的解析^[2]。

种子既是植物完整生活史的终点,也是其生长发育的起点,植物能通过种子携带微生物实现在不同代际间保存微生物的目的^[3]。种子所携带的菌群也被认为能够更加有效地占据新生植株的生态位,进而通过优先效应^[4]调控植物微生物群的组装,并最终影响其群落结构。在种子贮存过程中存在的共栖菌,则可能保护种子免受病原微生物的侵染。例如,水稻(*Oryza sativa* L.)种子的一种内生细菌通过干扰毒力因子的合成来阻止伯克氏病原菌的侵染^[5];鹰嘴豆种子分离的一种内生细菌能够抑制尖孢镰刀菌的生长,提高植物对该病原菌的抗性^[6]等。

细菌菌群是种子微生物群的主要组成部分^[7],其被证明能够调控植物的生长和健康。例如,从拟南芥^[8]、玉米^[9]、番茄^[10]等植物种子中分离的细菌在固氮、生长素合成、磷酸盐溶解特性上表现优异;部分种子细菌^[10]具有 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)脱氨酶活性或铁载体活性,可以促进植物生长;从水稻^[5]、玉米^[11]种子中分离的细菌能拮抗病原菌,从而赋予植物抗病特性。

目前关于种子菌群的研究多集中在可培养菌株,这类研究难以形成对种子菌群结构的整体认识,且无法进行比较准确的定量分析。组学技术的进步有助于在高维度上综合认识种子微生物组的特性,从而实现了对种子菌群结构多样性的清晰阐述。

本研究以不同种植地域的多个水稻品种的种子作为研究材料,通过 16S rDNA 介导的菌群定量分析方法和高通量二代测序方法^[12],全面解析了水稻种子菌群的群落大小、组成结构和影响因素,并鉴定了核心菌群。本研究可为

多种植物种子菌群的研究提供可借鉴的研究方法,为通过种子菌群调控植物性状的策略提供关键数据。

1 材料与方法

1.1 水稻种子材料

本研究以 2020 年收获于海南(109.755 03°E, 18.403 23°W)和天津(117.504 917°E, 39.580 624°W) 2 个农场的 9 种粳稻和 9 种籼稻的种子作为研究材料,品种名称如表 1 所示,结果部分的图片中均以括号内缩写表示相应品种。

1.2 种子总 DNA 的提取和 16S rDNA 二代测序

为避免来自环境的细菌黏附于稻壳表面,水稻种子先进行表面除菌处理。表面除菌实验在超净工作台内进行,将种子依次用 70%乙醇

表 1 本研究所使用的水稻品种

Table 1 Rice cultivars used in the study

粳稻 Japonica	籼稻 Indica
龙粳 31	黄华占
Longjing 31 (LJ 31)	Huanghuazhan (HHZ)
吉粳 88	双抗明占
Jijing 88 (JJ 88)	Shuangkangmingzhan (SKMZ)
淮稻 5 号	泰国小香米
Huaidao 5 (HD 5)	Taiguoxiaoxiangmi (TGXXM)
秀水 321	9311
Xiushui 321 (XS 321)	
中科发 5 号	明恢 63
Zhongkefa 5 (ZKF 5)	Minghui 63 (MH 63)
中科发 8 号	明恢 164
Zhongkefa 8 (ZKF 8)	Minghui 164 (MH 164)
武运粳 29	宜恢 1577
Wuyunjing 29 (WYJ 29)	Yihui 1577 (YH 1577)
津川 1 号	蜀恢 527
Jinchuan 1 (JC 1)	Shuhui 527 (SH 527)
金稻 919	蜀恢 498
Jindao 919 (JD 919)	Shuhui 498 (SH 498)

清洗 1 min; 1.5% NaClO 清洗 30 min; 无菌水清洗 3 次, 每次 10 min。表面除菌后的种子经高速组织研磨仪研磨后, 使用 CTAB/NaCl 法提取种子总 DNA。以 PCR 引物 322F-A/796R^[12] 扩增 16S rDNA 的 V₃-V₄ 区, 构建扩增子文库。其中, barcode 序列由上海美吉生物医药科技有限公司提供。PCR 反应体系(30 μL)如下: 10×PCR Buffer 3 μL, 50 mmol/L MgCl₂ 0.9 μL, 10 mmol/L dNTPs Mix 0.6 μL, *Taq* DNA Polymerase 0.12 μL, 模板 DNA 2 μL, barcode primers (10 μmol/L)各 0.6 μL, ddH₂O 22.2 μL。PCR 扩增程序如下: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 33 个循环; 72 °C 7 min。文库浓度和质量检测合格后, 通过 Illumina MiSeq PE300 平台进行细菌 16S rDNA 扩增子测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

1.3 水稻种子细菌含量的定量检测

水稻种子中细菌的定量使用实时荧光定量 PCR 法测定, 由引物 322F-A/796R 扩增细菌 16S rDNA 片段, 内参为水稻的 *actin* 基因。反应体系(25 μL)如下: 2×SYBR Green Mix 12.5 μL, 模板 DNA 2 μL, 322F-A/796R (10 μmol/L)各 0.5 μL, ddH₂O 9.5 μL。qPCR 扩增程序如下: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 44 个循环; 95 °C 30 s。所有样品均进行 3 次重复试验。

1.4 数据处理及统计分析

在 Excel 2019 中, 将 qPCR 的 CT 值代入标准曲线^[12]计算水稻种子的平均细菌含量。在 IBM SPSS Statistics 26.0 中, 使用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA)检验不同品种种子样本的细菌含量的显著性差异, $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义, 用不同小写字母表示。在 GraphPad Prism 8.3.0 中, 使用 one-way ANOVA 检验不同种植地域

间水稻种子样本的含菌量的显著性差异, ns: 无显著差异; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。使用 Student's *t*-test 检验海南与天津两地域间、粳稻与籼稻亚种间的含菌量显著性差异, ns: 无显著差异; *: $P < 0.05$ 。柱状图中, 样本数值以“平均值±标准差(standard deviation, SD)”形式表示。

使用 Flash 1.2.11 拼接双端测序下机的原始序列, QIIME 1.9.1 对序列质量进行质控和过滤, 得到高质量的 tags。按照 97%的一致性, 使用 Uparse 11 (<http://www.drive5.com/uparse/>)对有效 tags 序列进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)的聚类, 其中, 使用 RDP Classifier 2.13 比对 OTU 代表性序列, 以 Silva 138 (<https://www.arb-silva.de/>)为参考数据库注释物种。本文所使用的细菌 16S rRNA 基因测序原始数据已存放在国家微生物数据中心(National Microbial Data Center, NMDC) (<http://nmdc.cn/>)序列读取档案(accession No. NMDC40029376-40029555)中。

使用 R 语言 3.3.1 进行样本群落组成差异的主坐标分析(principal co-ordinate analysis, PCoA)和作图。所有的 PCoA 均在 OTU 水平下, 使用二进制-欧几里德距离算法进行。PCoA 的组间差异检验使用 Adonis, 置换次数 999。使用 R 语言 3.3.1 和 jvonn (<http://jvonn.toulouse.inra.fr/example.html>)绘制 OTU 分类水平的维恩图。核心菌群中, 使用 one-way ANOVA 检验各 OTU 相对丰度在不同组别的显著性差异, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 水稻品种对种子含菌量有显著影响

本研究首先用 qPCR 方法^[12]对水稻种子的含菌量进行了绝对定量。这里选取了 18 个水

稻品种, 每个品种分别来自海南和天津 2 个地域, 共 36 组样本, 其中每组样本制备 10 个 DNA 样本, 每个 DNA 样本由 3 粒种子提取总 DNA 构成。测定 360 个 DNA 样本的细菌含量, 结果显示, 所有的水稻种子均含有细菌, 平均含菌量为 3.05×10^4 /粒。每 50 粒种子的重量约为 1 g, 则每克种子的平均含菌量为 1.53×10^6 (图 1A)。

由于植物菌群的组成和结构主要受到基因型、土壤的影响^[13], 本研究将水稻种子分为不同品种和种植地域的样本, 以探究这 2 个因素对种子含菌量的影响。所选择的地域为海南和天津, 种子收获于同一年份, 从 2 个地域分别采收 18 种水稻种子, 其中 9 种为粳稻、9 种为籼稻。利用 qPCR 方法测定了每种水稻种子的含菌量, 并进行了品种间和地域间的比较。结果表明, 水稻品种对种子含菌量有显著影响, 不同品种的水稻种子在同一地域内含菌量差异显著, 例如 LJ 31 的含菌量显著低于 JD 919、SH 527 和 ZKF 8, HHZ 的含菌量显著低于 MH 63、YH 1577 和 SH 498 (图 1B、1C) 等。但是, 在粳稻和籼稻亚种水平上, 两者的含菌量无显著差异(图 1D)。另一方面, 种植地域对种子含菌量无显著影响, 18 个品种中有 17 个品种的种子含菌量不因种植地域而发生显著差异(图 1E)。海南和天津地区的水稻种子总体含菌量也无显著差异(图 1F)。

2.2 水稻种子菌群的组成和结构受品种、地域的影响

通过二代测序分析了不同品种和地域的水稻种子的菌群组成及结构。共选取了 18 个水稻品种, 每个品种分别来自海南和天津 2 个地域, 共 36 组样本进行试验, 其中每组样本制备 5 个 DNA 样本, 每个 DNA 样本由 3 粒种子提取的总 DNA 构成。对 180 个扩增子文库进

行二代测序, 并对细菌的门、属水平进行了分类。结果显示, 水稻种子细菌主要属于变形菌门 (*Proteobacteria*, 89.80%)、放线菌门 (*Actinobacteriota*, 9.02%)、厚壁菌门 (*Firmicutes*, 0.64%) 和拟杆菌门 (*Bacteroidota*, 0.53%), 其中变形菌门占绝对优势(图 2A)。在属水平上, 泛菌属 (*Pantoea*, 27.70%)、根瘤菌群属 (*Rhizobium* group, 包括 *Allorhizobium*、*Neorhizobium*、*Pararhizobium*、*Rhizobium* 4 个属, 19.63%)、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*, 12.08%)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*, 8.67%)、短小杆菌属 (*Curtobacterium*, 8.23%)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*, 7.81%) 和黄单胞菌属 (*Xanthomonas*, 4.66%) 等为主要的细菌类群(图 2B)。

利用 PCoA 分析不同地域的水稻种子的菌群结构差异, 结果显示, 除 YH 1577 外, 其余 17 个品种的水稻种子在海南和天津 2 个地域的菌群结构有显著差异(图 3)。这说明种植地域对水稻种子的菌群结构有重要的影响。

利用 PCoA 分析同一地域内不同品种的水稻种子的菌群结构差异, 结果显示, 在海南和天津 2 个地域, 水稻品种对种子的菌群结构有不同程度的影响, 有些品种的菌群结构相似, 有些品种的菌群结构明显不同。例如, JJ 88 与 HD 5、XS 321、WYJ 29 的菌群结构有显著差异(图 4A、4C); ZKF 5 和 JD 919 之间, SKMZ 和 YH 1577 之间的菌群结构也存在显著差异; 而 HD 5、WYJ 29 和 XS 321 之间, HHZ、SH 527 和 SH 498 之间的菌群结构无显著差异(图 4A-4D)。

已有研究表明粳稻和籼稻的根际菌群存在明显的差异^[14]。为了探究这种菌群差异是否同样存在于水稻种子的菌群中, 这里将 180 个扩增子文库按照粳稻和籼稻, 以及海南和天津的地域分为 4 组, 命名为海南粳稻、海南籼稻、

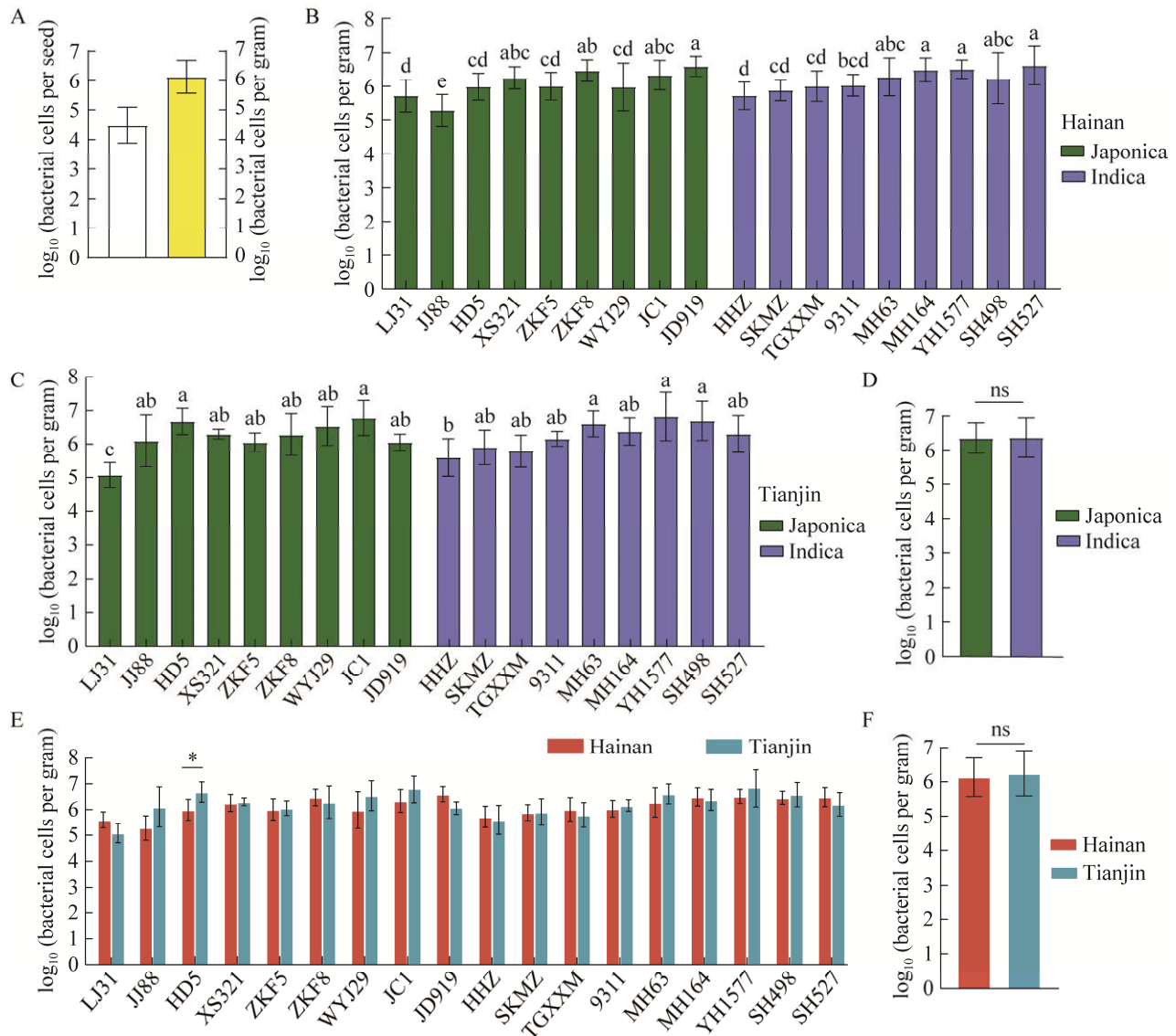


图 1 水稻种子细菌含量的定量测定及其影响因素分析

Figure 1 Quantitative measurement and influencing factors analysis of bacterial abundance in rice seeds. A: qPCR to measure bacterial 16S rDNA in rice seeds. Mean and SD were calculated from 360 DNA samples. White column indicates bacterial abundance per seed, and yellow column indicates bacterial abundance per gram of seed. B–D: Effect of rice cultivars on bacterial abundance in seeds. B and C show the bacterial abundance of 18 rice cultivars planted in Hainan (B) and Tianjin (C), respectively, and D shows the comparison of bacterial abundance between japonica and indica. E, F: Effect of planting regions on bacterial abundance in seeds. E shows the difference in bacterial abundance of 18 cultivars planted in different regions, and F shows the overall difference in bacterial abundance between Hainan and Tianjin. B, C: One-way ANOVA was used to test for significant differences, different letters indicate significant differences ($P < 0.05$). D, F: Student’s t -test was used to test for significant differences, ns: Not significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. B, C and E: Each column represents one cultivar. Mean and SD were calculated from 10 DNA samples.

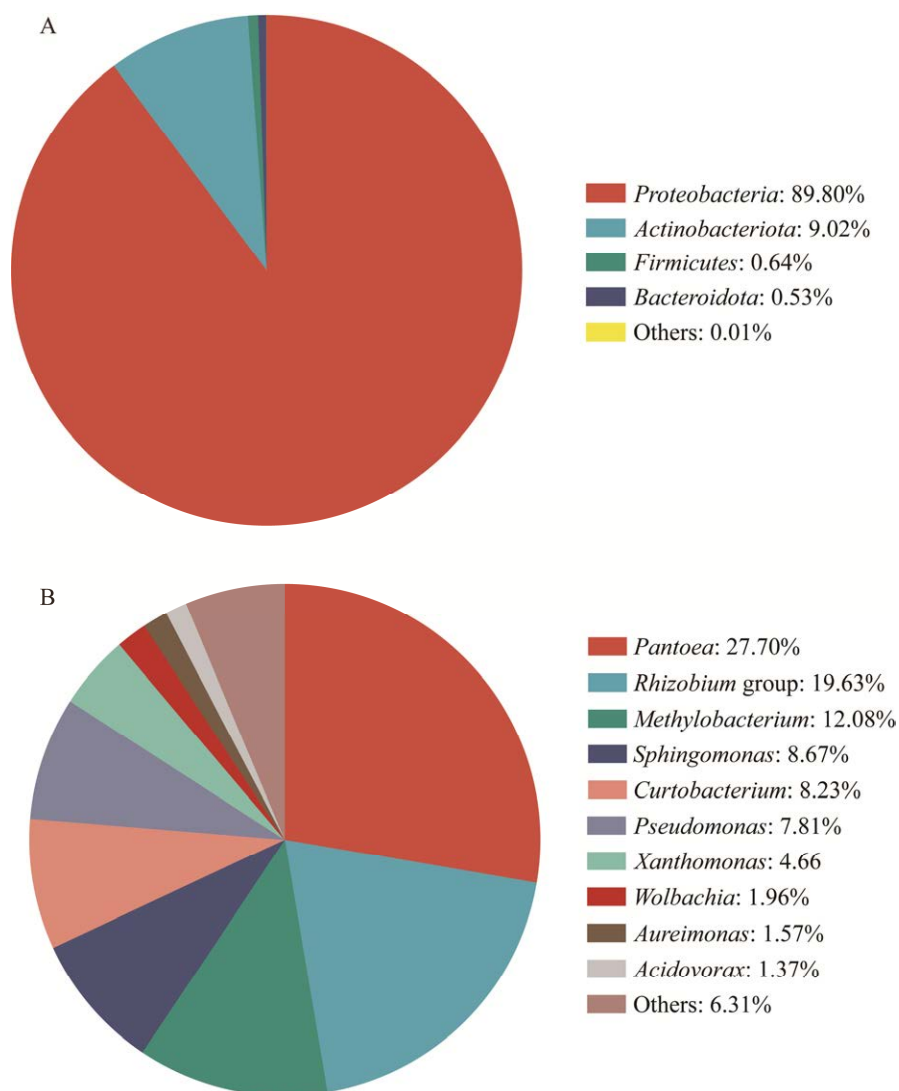


图 2 16S rDNA 二代测序分析水稻种子菌群的组成和结构

Figure 2 Bacterial composition and structure in rice seed analyzed by 16S rDNA amplicon sequencing. A: Relative abundance at the phylum level. Phyla with relative abundance <0.5% were classified as others. B: Relative abundance at the genus level. Genera with relative abundance <1% were classified as others. The figures show the average of 180 sequencing samples.

天津粳稻和天津籼稻，每组包含 45 个扩增子文库。使用 PCoA 分析了这 4 组文库的菌群结构差异。结果显示，在海南或天津，粳稻和籼稻的种子菌群结构无显著差异。但是，在第一主坐标轴上，海南和天津的样本有明显的分离(图 4E)，说明地域显著影响种子菌群结构，这与单个品种的结果一致(图 3)。

2.3 水稻种子的核心菌群的组成

核心菌群是指在宿主群体中普遍存在，且相对丰度较高的微生物类群^[15-16]。本研究中按照如下标准筛选水稻种子的核心菌群：存在于海南、天津两地全部水稻品种的种子中，且相对丰度>3.5%的 OTU。这里使用维恩分析确定了海南粳稻、海南籼稻、天津粳稻和天津籼稻

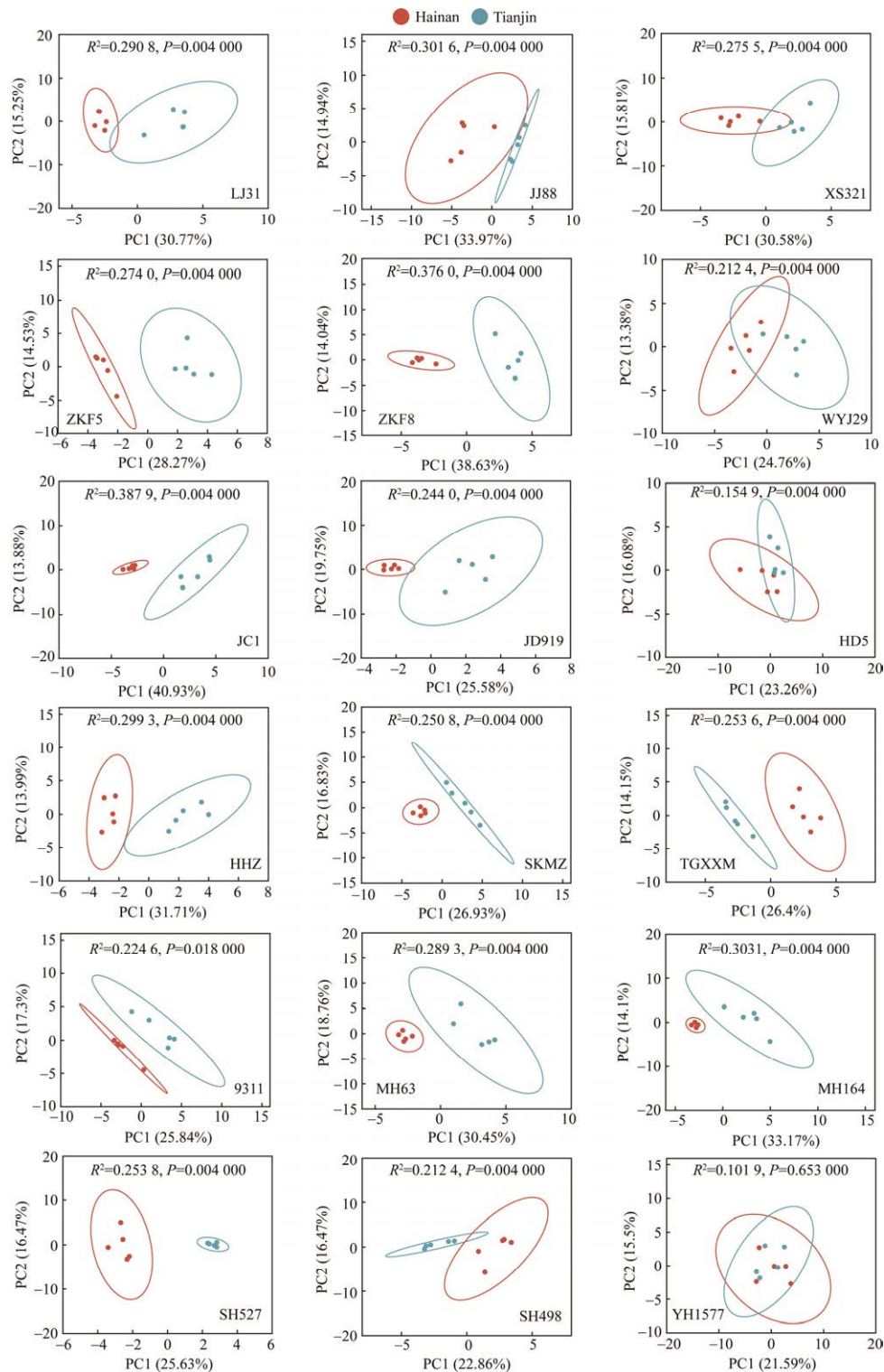


图3 种植地域对水稻种子细菌群落结构的影响

Figure 3 Effect of planting regions on bacterial community structure in rice seeds. PCoA was based on OTU level, Binary-Euclidean distance. Significant differences were tested by multivariate permutation variance analysis and R and P values were given. Ellipses represent 95% confidence intervals ($n=5$).

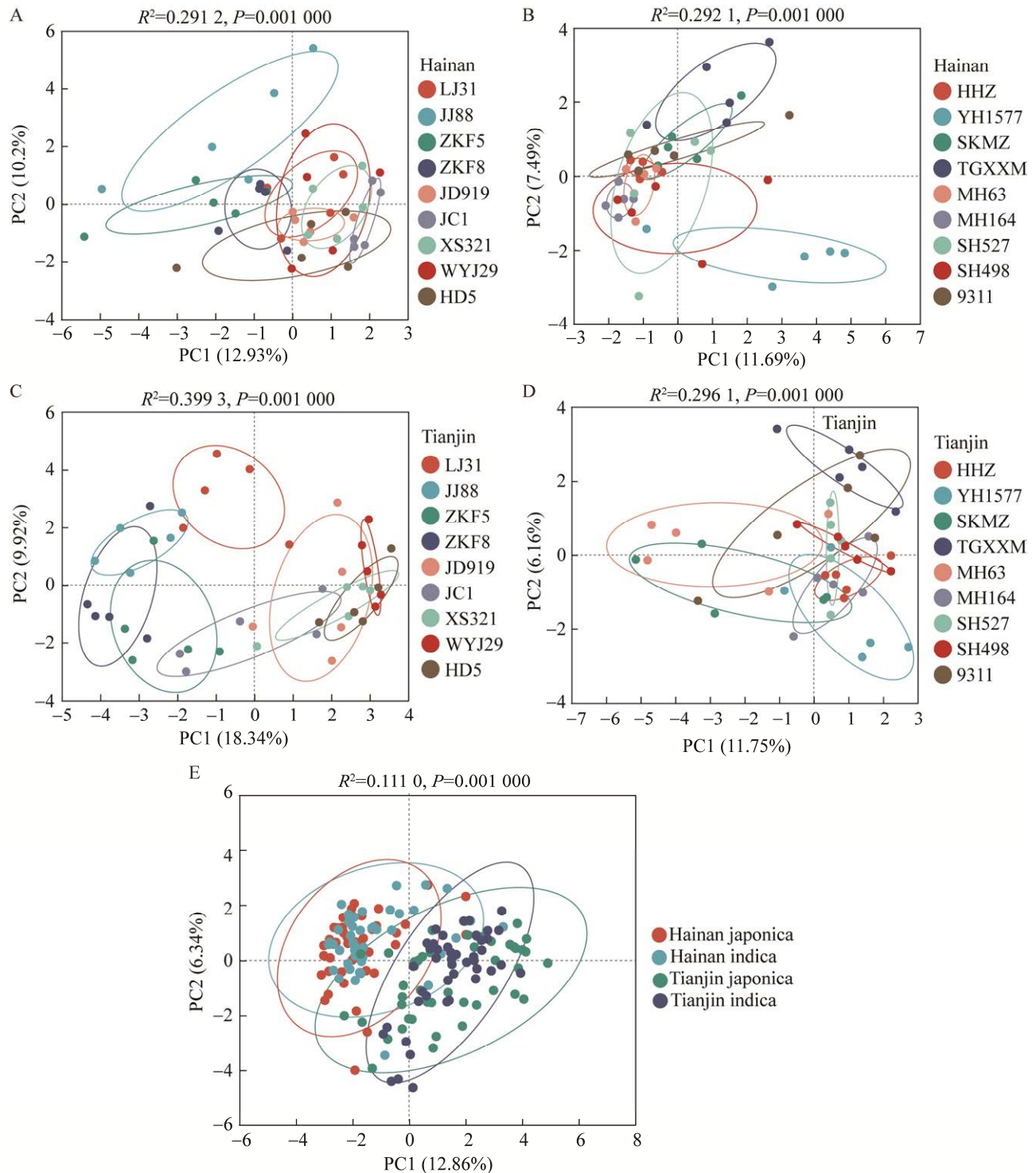


图 4 水稻品种对种子细菌群落结构的影响

Figure 4 Effect of rice cultivars on bacterial community structure in rice seeds. PCoA was based on OTU level, Binary-Euclidean distance. Significant differences were tested by multivariate permutation variance analysis and R and P values were given. Ellipses represent 95% confidence intervals ($n=5$).

4 组样本中的共有 OTU (图 5A), 并进一步筛选出 36 组样本的共有 OTU, 共计 43 条 OTU 序列(图 5B)。在这些共有 OTU 中, 有 8 条 OTU 序列的相对丰度>3.5%, 分别是 OTU 84、OTU 16、OTU 47、OTU 7、OTU 91、OTU 334、OTU 200 和 OTU 50, 即为核心 OTU。

这些核心 OTU 属于 7 个属, 主要是泛菌属

(OTU 84, 27.42%)、根瘤菌群属(OTU 16, 18.95%)、鞘氨醇单胞菌属(OTU 7, 7.81%)、甲基杆菌属(OTU 50 和 OTU 91, 11.24%)、假单胞菌属(OTU 334, 7.37%)、黄单胞菌属(OTU 200, 4.62%)、短小杆菌属(OTU 47, 8.15%) (图 5C)。在门水平上, 主要分布于变形菌门(OTU 84、OTU 16、OTU 7、OTU 91、OTU 50、OTU 334 和

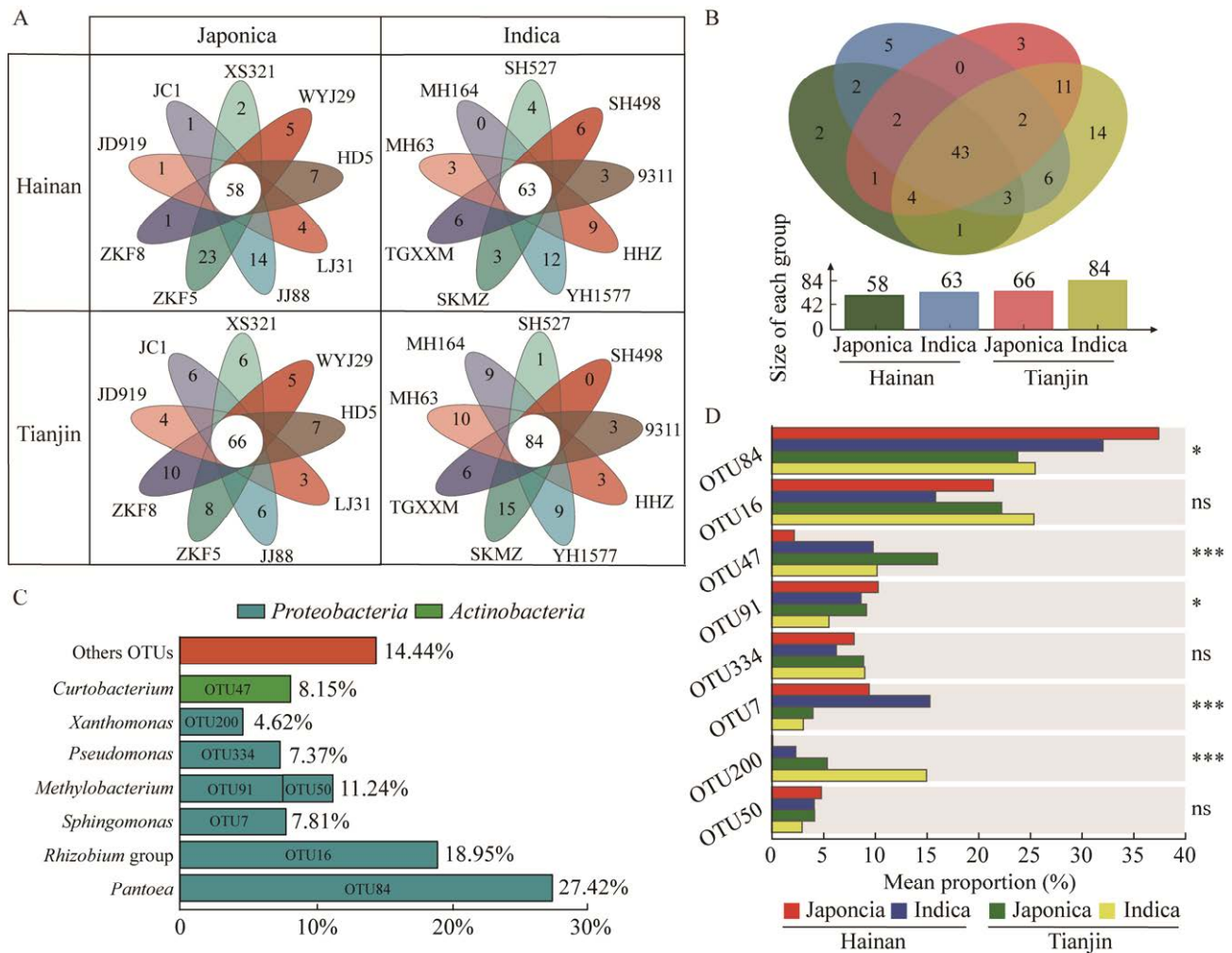


图 5 水稻种子的核心菌群

Figure 5 Core bacterial in rice seeds. A: Venn diagram showing the number of shared and unique OTUs within each group of seeds including Hainan japonica, Hainan indica, Tianjin japonica, and Tianjin indica. B: Venn diagram showing the number of shared and unique OTUs among each group of rice seeds, including Hainan japonica, Hainan indica, Tianjin japonica, and Tianjin indica. C: Relative abundance of core bacteria taxa at the phylum and genus level. D: Relative abundance of core bacteria taxa from different groups at the OTU level in the total seed microbiota. Significant differences were tested by one-way ANOVA, ns: Not significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

OTU 200, 77.41%)和放线菌门(OTU 47, 8.15%) (图 5C)。核心 OTU 占总细菌的 85.56% (图 5C)。

此外, 还比较了核心 OTU 的相对丰度随亚种和地域因素的变化。结果显示, 部分核心 OTU 的相对丰度随亚种和地域显著改变, 例如 OTU 84 在海南粳稻中占比最高(图 5D), OTU 200 在天津粳稻中占比显著高于其他 3 组(Student's *t*-test, $P < 0.000\ 02$), 而 OTU 16、OTU 334 和 OTU 50 在 4 组水稻中无显著差异(图 5D)。

这些结果说明了水稻种子存在核心菌群, 并且核心菌群在整个细菌群落中占据主导地位。

3 讨论

本研究首次利用非培养法对水稻种子的细菌群落进行了定量和结构分析, 并探究了地域和品种对种子菌群的影响。结果发现, 经过表面除菌的水稻种子内部存在共栖细菌, 种子的平均细菌含量为 3.05×10^4 /粒(图 1A)。水稻品种对种子的细菌含量有显著影响, 而地域不影响种子含菌量(图 1B–1F)。水稻种子的细菌群落与根际^[14]和叶际^[13]的细菌群落在门水平上相似, 均以变形菌门为主(图 2A)。地域对水稻种子的细菌群落结构有重要影响, 不同地域的水稻种子的群落结构存在显著差异(图 3、图 4E)。品种对水稻种子的细菌群落结构也有一定影响, 但需要具体分析不同品种之间的差异(图 4A–4D)。在亚种水平上, 粳稻和籼稻的种子细菌群落无显著差异(图 4E)。水稻种子存在核心细菌群落, 不受地域和品种的影响, 且占总细菌群落的 85.56% (图 5C)。

本研究首次使用非培养法定量分析了水稻种子的细菌含量。结果发现, 每克种子的平均细菌含量为 1.53×10^6 (图 1A), 这与水稻叶部细菌含量^[12]相当, 但远低于根际的细菌含量^[17–18]。不同地域的同一品种水稻种子的细菌含量没有

显著差异(只有 1 个品种受地域影响), 但由于只选择了 2 个地域, 这一结果还需要更多地域的数据来验证。而同一地域的不同品种水稻种子的细菌含量则有较大差异, 未来将进一步分析具体品种之间的差异, 并探究相关的基因因素。尽管水稻种子的细菌含量有差异, 但总体上每粒种子的细菌丰度均在 10^4 – 10^5 之间, 这可能说明一定水平的细菌含量对水稻种子是必要的。了解水稻种子的细菌含量和分布特征, 有助于利用这些细菌提高种子的抗病抗逆能力。

本研究用二代测序分析了水稻种子的细菌群落结构, 并探究了地域和品种的影响。已有研究表明, 这 2 个因素均能对植物的细菌群落结构产生影响。例如, 土壤类型和宿主物种均能导致 6 种植物的根际细菌群落结构出现显著差异, 其中土壤类型的影响更大^[19]; 不同地理来源的丹参种子的细菌群落结构也有显著多样性^[20]; 油菜种子细菌群落结构与品种有关^[21]等。品种对细菌群落的影响可能通过基因型对生态位内环境(包括营养水平、免疫系统状态、pH 值等)的调节而实现。例如, 粳稻、籼稻的根系微生物群和氮肥利用效率在大田条件下明显不同, 这与籼稻品种的 *NRT1.1B* 基因能够影响根际氮素循环并富集固氮菌有关^[14]; 拟南芥 *mfec* 四突变体由于免疫缺陷使得其叶部内生微生物组的丰度和多样性发生显著变化^[22]。此外, 也比较了粳稻和籼稻的种子细菌群落结构, 发现两者没有显著差异(图 4E)。而不同品种之间的细菌群落结构差异则需要具体分析, 相关的基因因素还有待进一步发掘。

本研究发现水稻种子存在核心菌群, 主要由泛菌属、根瘤菌群属、甲基杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、短小杆菌属、假单胞菌属和黄单胞菌属等组成。这些菌群可能进入新生植株, 也可能在水稻的代际间传递, 对水稻的生物学功

能有重要影响。与水稻根际^[23]和叶际^[24]的细菌群落相比,这些种子核心菌在属水平上也是根和叶中主要的细菌类群,说明种子菌群与植株菌群有一定的连续性。由于种子有发育和贮存的过程,这些菌群在种子的营养和抗病抗逆中的作用也值得研究。例如,玉米^[25]和小麦^[26]种子中的泛菌属部分菌株能够促进植物生长或抑制真菌;假单胞菌属是一种常见的植物促生长细菌,能够促进植物根系发育^[27]、增强植物对病原菌的抵抗力^[28];鞘氨醇单胞菌也有促生长及生物修复的能力^[29]。鉴定水稻种子的核心菌群为探究种传微生物与植物的互作提供了基础和资源。

4 结论

本研究首次用非培养法定量分析了水稻种子的细菌含量,用二代测序分析了水稻种子的细菌群落结构,并探究了地域和品种的影响。证明:(1) 经过表面除菌的水稻种子内部存在共栖细菌,每克种子的平均细菌含量为 1.53×10^6 ,这一含量受水稻品种的显著影响;(2) 水稻种子的细菌群落与水稻植株的细菌群落有相似之处,均以变形菌门为主要的细菌门类,也包含放线菌门、厚壁菌门和拟杆菌门;水稻种子的细菌群落成员大部分也是水稻植株的细菌群落成员;水稻种子的细菌群落结构受地域的重要影响,而粳稻和籼稻之间无显著差异;(3) 水稻种子存在核心细菌群落。

参考文献

[1] VANDENKOORNHUYSE P, QUAISER A, DUHAMEL M, le van A, DUFRESNE A. The importance of the microbiome of the plant holobiont[J]. *New Phytologist*, 2015, 206(4): 1196-1206.

[2] TRIVEDI P, LEACH JE, TRINGE SG, SA TM, SINGH BK. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(11): 607-621.

[3] VANNIER N, MONY C, BITTEBIERE AK, MICHON-COUDOUEL S, BIGET M, VANDENKOORNHUYSE P. A microorganisms' journey between plant generations[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 79.

[4] DEBRAY R, HERBERT RA, JAFFE AL, CRITS-CHRISTOPH A, POWER ME, KOSKELLA B. Priority effects in microbiome assembly[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(2): 109-121.

[5] MATSUMOTO H, FAN XY, WANG Y, KUSSTATSCHER P, DUAN J, WU SL, CHEN SL, QIAO K, WANG YL, MA B, ZHU GN, HASHIDOKO Y, BERG G, CERNAVA T, WANG MC. Bacterial seed endophyte shapes disease resistance in rice[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(1): 60-72.

[6] MUKHERJEE A, SINGH BK, VERMA JP. Harnessing chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed endophytes for enhancing plant growth attributes and bio-controlling against *Fusarium* sp.[J]. *Microbiological Research*, 2020, 237: 126469.

[7] SHADE A, JACQUES MA, BARRET M. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 37: 15-22.

[8] TRUYENS S, WEYENS N, CUYPERS A, VANGRONSVELD J. Changes in the population of seed bacteria of transgenerationally Cd-exposed *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Biology*, 2013, 15(6): 971-981.

[9] JOHNSTON-MONJE D, RAIZADA MN. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20396.

[10] XU MS, SHENG JP, CHEN L, MEN YJ, GAN L, GUO ST, SHEN L. Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(3): 835-845.

[11] YANG FZ, ZHANG RY, WU XY, XU TJ, AHMAD S, ZHANG XX, ZHAO JR, LIU Y. An endophytic strain of the genus *Bacillus* isolated from the seeds of maize (*Zea mays* L.) has antagonistic activity against maize pathogenic strains[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 142: 104074.

[12] CHEN LY, ZHANG MT, LIU D, SUN HB, WU JX, HUO Y, CHEN XY, FANG RX, ZHANG LL. Designing specific bacterial 16S primers to sequence

- and quantitate plant endo-bacteriome[J]. *Science China Life Sciences*, 2022, 65(5): 1000-1013.
- [13] KNIEF C, DELMOTTE N, CHAFFRON S, STARK M, INNEREBNER G, WASSMANN R, von MERING C, VORHOLT JA. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(7): 1378-1390.
- [14] ZHANG JY, LIU YX, ZHANG N, HU B, JIN T, XU HR, QIN Y, YAN PX, ZHANG XN, GUO XX, HUI J, CAO SY, WANG X, WANG C, WANG H, QU BY, FAN GY, YUAN LX, GARRIDO-OTER R, CHU CC, et al. *NRT1.1B* is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(6): 676-684.
- [15] RISELY A. Applying the core microbiome to understand host-microbe systems[J]. *Journal of Animal Ecology*, 2020, 89(7): 1549-1558.
- [16] NEU AT, ALLEN EE, ROY K. Defining and quantifying the core microbiome: challenges and prospects[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(51): e2104429118.
- [17] HACQUARD S, GARRIDO-OTER R, GONZÁLEZ A, SPAEPEN S, ACKERMANN G, LEBEIS S, McHARDY AC, DANGL JL, KNIGHT R, LEY R, SCHULZE-LEFERT P. Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms[J]. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(5): 603-616.
- [18] WANG XL, WANG MX, XIE XG, GUO SY, ZHOU Y, ZHANG XB, YU N, WANG ET. An amplification-selection model for quantified rhizosphere microbiota assembly[J]. *Science Bulletin*, 2020, 65(12): 983-986.
- [19] VIEIRA S, SIKORSKI J, DIETZ S, HERZ K, SCHRUMPF M, BRUELHEIDE H, SCHEEL D, FRIEDRICH MW, OVERMANN J. Drivers of the composition of active rhizosphere bacterial communities in temperate grasslands[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(2): 463-475.
- [20] CHEN HM, WU HX, YAN B, ZHAO HG, LIU FH, ZHANG HH, SHENG Q, MIAO F, LIANG ZS. Core microbiome of medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* seed: a rich reservoir of beneficial microbes for secondary metabolism?[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(3): 672.
- [21] RYBAKOVA D, MANCINELLI R, WIKSTRÖM M, BIRCH-JENSEN AS, POSTMA J, EHLERS RU, GOERTZ S, BERG G. The structure of the *Brassica napus* seed microbiome is cultivar-dependent and affects the interactions of symbionts and pathogens[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 104.
- [22] CHEN T, NOMURA K, WANG XL, SOHRABI R, XU J, YAO LY, PAASCH BC, MA L, KREMER J, CHENG YT, ZHANG L, WANG N, WANG ET, XIN XF, HE SY. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere[J]. *Nature*, 2020, 580(7805): 653-657.
- [23] ZHANG XX, MA YN, WANG X, LIAO KJ, HE SW, ZHAO X, GUO HB, ZHAO DF, WEI HL. Dynamics of rice microbiomes reveal core vertically transmitted seed endophytes[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 216.
- [24] LIU XY, MATSUMOTO H, LV TX, ZHAN CF, FANG HD, PAN QQ, XU HR, FAN XY, CHU TY, CHEN SL, QIAO K, MA YN, SUN L, WANG QW, WANG MC. Phyllosphere microbiome induces host metabolic defence against rice false-smut disease[J]. *Nature Microbiology*, 2023, 8(8): 1419-1433.
- [25] SHEIBANI-TEZERJI R, NAVEED M, JEHL MA, SESSITSCH A, RATTEI T, MITTER B. The genomes of closely related *Pantoea ananatis* maize seed endophytes having different effects on the host plant differ in secretion system genes and mobile genetic elements[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 440.
- [26] LINKS MG, DEMEKE T, GRÄFENHAN T, HILL JE, HEMMINGSEN SM, DUMONCEAUX TJ. Simultaneous profiling of seed-associated bacteria and fungi reveals antagonistic interactions between microorganisms within a shared epiphytic microbiome on *Triticum* and *Brassica* seeds[J]. *New Phytologist*, 2014, 202(2): 542-553.
- [27] ZAMIOUDIS C, MASTRANESTI P, DHONUKSHE P, BLILOU I, PIETERSE CMJ. Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria[J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(1): 304-318.
- [28] van de MORTEL JE, de VOS RCH, DEKKERS E, PINEDA A, GUILLOD L, BOUWMEESTER K, van LOON JJA, DICKE M, RAAIJMAKERS JM. Metabolic and transcriptomic changes induced in *Arabidopsis* by the rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* SS101[J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(4): 2173-2188.
- [29] PAN FS, MENG Q, WANG Q, LUO S, CHEN B, KHAN KY, YANG XE, FENG Y. Endophytic bacterium *Sphingomonas* SaMR12 promotes cadmium accumulation by increasing glutathione biosynthesis in *Sedum alfredii* Hance[J]. *Chemosphere*, 2016, 154: 358-366.