

## 研究报告

# 田菁内生菌定殖及其与多糖混合浸种的耐盐促生效果

庞诗琪<sup>1</sup>, 李玮<sup>2</sup>, 王丹丹<sup>\*1</sup>, 解志红<sup>\*1</sup>

1 山东农业大学资源与环境学院, 山东 泰安 271000

2 山西农业大学植物保护学院, 山西 太谷 030800

庞诗琪, 李玮, 王丹丹, 解志红. 田菁内生菌定殖及其与多糖混合浸种的耐盐促生效果[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3429-3439.

PANG Shiqi, LI Wei, WANG Dandan, XIE Zhihong. Colonization of sesbania seed endophytic bacterium and salt-tolerant and growth-promoting effect of mixed seed soaking with endophytic bacterium and polysaccharide[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3429-3439.

**摘要:** 【背景】土壤盐渍化已经成为日益严重的世界性问题, 盐渍化不仅影响作物的产量, 还会影响土壤的理化性质, 抑制种子的萌发, 阻碍植物正常生长, 以及种子对水分和养分的吸收, 进而影响作物的产量。【目的】玉米在盐渍土壤上生长受限, 探究在中、高盐浓度下田菁种子内生菌与田菁胶混合浸种对玉米发芽的影响, 为促进盐渍土玉米生长提供技术支持。【方法】利用LB液体培养基测定田菁种子内生菌贝莱斯芽孢杆菌 ZH60 的耐盐性; 分别利用 1%浓度田菁胶、 $OD_{600}$  为 0.8 的 ZH60 菌悬液及两者混合液对玉米浸种 3 h, 自然风干后分别置于 0、100 和 200 mmol/L NaCl 的 0.8%琼脂培养基上培养, 测定玉米种子发芽势、发芽率、根长及芽长。将两叶一心期的玉米幼苗移至装有蛭石的花盆中培养, 用荧光标记的内生菌 ZH60 灌根, 分别于 1、5、11、17、25 d 取玉米根系研磨, 利用平板菌落计数法测定内生菌在玉米根部的定殖量; 利用激光共聚焦显微镜观察第 28 天 ZH60 在玉米根部的定殖情况。【结果】菌株 ZH60 耐 11%的 NaCl 盐浓度, 在中、高盐浓度下混合浸种的发芽势较对照组分别提高了 28%、22%、30%; 芽长提高了 158%、163%、150%; 根长提高了 36.8%、21.4%、42.9%。ZH60 能够在玉米根部定殖, 定殖量从第 1 天的  $2 \times 10^4$  CFU/g 提高到第 25 天的  $2.5 \times 10^4$  CFU/g。【结论】田菁种子内生菌贝莱斯芽孢杆菌 ZH60 具有较高的耐盐性, 在盐浓度下与田菁胶共混浸种均明显提高了玉米发芽势及根长、芽长, 且能在玉米根部定殖, 为实现盐渍土上提高玉米出芽和生根提供了菌株资源。

**关键词:** 田菁种子内生菌; 田菁胶; 玉米; 耐盐; 定殖

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1201700); 山东省重点研发计划(2021CXGC010804); 山东省自然科学基金(ZR2021QC175)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1201700), the Key Research and Development Program of Shandong Province (2021CXGC010804), and the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021QC175).

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Dandan, wangddnan@163.com; XIE Zhihong, zhihongxie211@163.com

Received: 2022-11-15; Accepted: 2022-12-23; Published online: 2023-02-08

# Colonization of sesbania seed endophytic bacterium and salt-tolerant and growth-promoting effect of mixed seed soaking with endophytic bacterium and polysaccharide

PANG Shiqi<sup>1</sup>, LI Wei<sup>2</sup>, WANG Dandan<sup>\*1</sup>, XIE Zhihong<sup>\*1</sup>

1 College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, Shandong, China

2 College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taigu 030800, Shanxi, China

**Abstract:** **[Background]** Soil salinization has become an increasingly serious problem worldwide, affecting not only crop yield but also the physical and chemical properties of soil. It can inhibit seed germination and hinder the normal growth and the water and nutrient uptake of crops, thereby reducing crop yield. **[Objective]** Maize growth is limited in saline soil. We studied the effects of mixed soaking with sesbania seed endophytes and sesbania gum on the germination of maize seeds exposed to medium and high concentrations of salt, aiming to provide technical support for improving maize growth in saline soil. **[Methods]** The LB liquid medium was used to determine the salt tolerance of the sesbania seed endophytic bacterium *Bacillus velezensis* ZH60. Maize seeds were soaked with 1% sesbania gum, ZH60 suspension ( $OD_{600}=0.8$ ), and their mixture for 3 h. After natural drying, the seeds were cultured on 0.8% agar plates containing 0, 100, and 200 mmol/L NaCl, respectively. The germination rate, root length, and bud length of maize were measured. The maize seedlings at the two-leaf stage were transplanted to the pots filled with vermiculite and irrigated with fluorescence-labeled ZH60 suspension. The maize roots were collected after 1, 5, 11, 17, and 25 days, and the colonization of endophytic bacteria in maize roots was determined by plate colony counting. The colonization of ZH60 in maize roots on day 28 was observed under a scanning confocal microscope. **[Results]** The strain ZH60 can tolerate 11% NaCl. Compared with the control group, the mixed soaking of maize seeds with 1% sesbania gum, ZH60 suspension, and their mixture increased the germination potential by 28%, 22%, and 30%, the bud length by 158%, 163%, and 150%, and the root length by 36.8%, 21.4%, and 42.9%, respectively, under medium and high concentrations of NaCl. ZH60 could colonize maize roots, and the colonization increased from  $2 \times 10^4$  CFU/g on day 1 to  $2.5 \times 10^4$  CFU/g on day 25. **[Conclusion]** The endophytic bacterium *B. velezensis* ZH60 has high salt tolerance. The germination potential, root length, and bud length of maize are increased by mixed seed soaking with ZH60 and sesbania gum. *B. velezensis* ZH60 can colonize the roots of maize, which provides strain resources for improving germination and rooting of maize in saline soil.

**Keywords:** sesbania seed endophyte; sesbania gum; maize; salt tolerance; colonization

土壤盐渍化已经成为日益严重的世界性问题, 全球 50%的灌溉土壤面临着土壤盐渍化的问题, 并且正在以每年 1%的速度加剧<sup>[1]</sup>, 我国

土壤盐渍化面积约 1 亿  $\text{hm}^2$ , 占世界盐渍土面积的 10%左右, 主要分布于西北、华北、东北地区<sup>[2]</sup>。土壤盐渍化导致耕地面积、作物产量

与作物品质大幅下降<sup>[3]</sup>。土壤中的盐以离子或化合物的形式存在,总盐分含量与  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  含量均为显著正相关关系<sup>[4]</sup>,植物吸收土壤中的可溶性盐供给植物所需营养物质,但过量累计会抑制植物的生长<sup>[5]</sup>。盐渍化不仅影响作物的产量,还会影响土壤的理化性质,抑制种子的萌发,阻碍植物正常生长,以及其对水分和养分的吸收,进而影响作物的产量<sup>[6]</sup>,通过植物根和微生物的相互作用,应用生物方法改善土壤健康,在盐渍土壤提高作物产量方面得到越来越多的应用。

植物内生菌指在健康植物细胞内或细胞间隙的全部阶段或部分阶段生活的微生物<sup>[7]</sup>,包括内生细菌、内生真菌及内生放线菌<sup>[8]</sup>,宿主植物不会因这些菌的存在而表现出外在的症状<sup>[9]</sup>。内生菌能够促进光合作用,分泌促进生长的调节剂,如吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)、细胞分裂素(cytokinin, CTK)、赤霉素(gibberellin, GA)等,从而促进植物生长<sup>[10]</sup>,可定殖在植物表皮细胞层或者组织器官内部,与植物互利共生<sup>[11]</sup>。越来越多的研究者开始关注内生菌与植物的互作关系。

田菁胶(sesbania gum, SG)源于豆科植物田菁种子内胚乳,主要由半乳糖、甘露糖构成<sup>[12]</sup>,是一种绿色环保的天然高分子化合物,分子量在  $2.3 \times 10^5$  Da 左右<sup>[13]</sup>。田菁胶具有很强的亲水性<sup>[14]</sup>,在食品、纺织、石油、医药、化妆品领域广泛应用<sup>[15]</sup>,而在农业上的应用鲜见报道。相较于化学试剂,生物改良剂田菁胶与田菁种子内生菌作为植物生长的促进剂更加环保,因此,本研究将田菁胶与田菁内生菌共混探究其对玉米的耐盐促生效果。

我们前期从田菁种子内分离出内生菌 ZH60, 16S rRNA 基因同源性分析将其鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*),具有产 IAA 及解无

机磷能力,能在田菁、玉米、辣椒、番茄等植株上定殖,可作为 PGPB 菌株用于生物肥料<sup>[16]</sup>,本研究将内生菌 ZH60 与其种子内胚乳提取的田菁胶结合,探究其作为复合浸种剂对粮食作物玉米的耐盐促生效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验室前期已从田菁种子中分离鉴定出贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) ZH60 (曾用菌株号 SC60),已于 2020 年 11 月 30 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC No. 21262。

供试玉米(*Zea mays* L.)种子为郑单 958。

LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0。0.8%琼脂培养基: 琼脂粉 8.0 g/L。100 mmol/L NaCl 琼脂(0.8%)培养基(g/L): 琼脂粉 8.0, NaCl 5.85。200 mmol/L NaCl 琼脂(0.8%)培养基(g/L): 琼脂粉 8.0, NaCl 11.7。1/2 MS 营养液: MS 培养基 20.87 g/L。

恒温振荡器,上海亿恒科学仪器有限公司;人工气候箱,宁波乐电仪器制造有限公司;激光共聚焦显微镜,德国蔡司。

### 1.2 内生菌 ZH60 耐盐性试验

将 LB 液体培养基的 NaCl 终浓度调为 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%, 5 mL 分装至试管中,接种 ZH60 后 37 °C、170 r/min 培养至对数生长期(12 h),测定  $OD_{600}$  值<sup>[17]</sup>。

### 1.3 平板发芽试验

ZH60 在 LB 液体培养基 37 °C、170 r/min 振荡培养 14 h 后,于 4 °C、4 000 r/min 离心 5 min,弃上清将菌体重悬于 1% (质量体积分数)田菁胶溶液中,调至菌悬液  $OD_{600}$  为 0.8;玉米种子浸于 75%酒精 1 min 后无菌水漂洗 3 次,2%

NaClO 消毒 5 min 后无菌水漂洗 3–6 次, 将消毒处理后的玉米种子浸于田菁胶菌悬液中 3 h, 然后于超净台内风干, 再分别摆入灭菌的 0.8% 琼脂培养基、100 mmol/L NaCl、200 mmol/L NaCl 琼脂(0.8%)培养基中, 每组处理 3 个重复。置于光照培养箱第 1 段 12 h 光照、温度 28 °C、湿度 65%; 第 2 段 12 h 黑暗、温度 25 °C、湿度 60% 培养。第 4 天测定其发芽势, 第 7 天测定根、芽长。

#### 1.4 ZH60 在玉米上的定殖

将消毒好的种子置于无菌 0.8% 琼脂培养基中于光照培养箱(光照培养箱第 1 段 12 h 光照、温度 28 °C、湿度 65%; 第 2 段 12 h 黑暗、温度 25 °C、湿度 60%)发芽; 将发芽 7 d 后长出根、芽的玉米种子移入含有 1/2 MS 营养液的珍珠岩培养基中水培, 光照培养箱内(培养箱条件同上)培养 1 周后, 取出幼苗, 无菌水冲洗根部 3 次, 前期绿色荧光蛋白标记的菌株 ZH60-GFP 在含 25 µg/mL 氯霉素、7.5 µg/mL 四环素的 LB 液体培养基内生长 16 h 左右, 4 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 于 1/2 MS 营养液中调至菌悬液  $OD_{600}$  为 0.8 备用; 玉米植株移入装有蛭石的花盆中(直径 10.5 cm、高 9.5 cm), 无菌水浇灌至花盆底部不再渗水; 玉米植株根部浇灌 ZH60-GFP 菌悬液使蛭石终浓度为  $2 \times 10^5$  CFU/g, 封口膜橡皮筋固定保湿, 每天补充损失的菌悬液, 重复 20 罐; 对照组浇灌等量的 1/2 MS 营养液, 分别于栽培后的第 1、5、7、11、17、25 天采集玉米根系样品, 取 0.1 g 玉米幼苗根系, 加入 0.9 mL 无菌水研磨均匀, 获得根系匀浆。将根系匀浆逐级梯度稀释至  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  并涂布含 7.5 µg/mL 四环素和 25 µg/mL 氯霉素的 LB 固体培养基。将该平板于 37 °C 培养 24 h 后, 用荧光显微镜观察发出绿色荧光的菌落并计数, 每个稀释梯度下平板

中发光菌落数取平均值。第 28 天, 取根部组织无菌水冲洗后切成 0.4–1.0 cm 的薄片, 置载玻片上装片, 激光共聚焦显微镜观察定殖情况<sup>[18]</sup>。

#### 1.5 数据分析

采用 Microsoft Excel 2019 软件进行数据整理与统计, 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和差异显著性检验(邓肯氏法,  $\alpha=0.05$ ), 图表中数据为平均值±标准误。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 ZH60 的耐盐性

菌株的耐盐性是在盐渍土壤中存活的重要指标, 如图 1 所示为内生贝莱斯芽孢杆菌 ZH60 分别在含 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15% NaCl 的 LB 液体培养基中振荡培养 24 h 后的  $OD_{600}$  值。菌株 ZH60 在 NaCl 盐浓度 11% 时  $OD_{600}$  为 0.23, 在 NaCl 盐浓度大于 11% 时菌株  $OD_{600}$  值小于 0.1, 因此菌株 ZH60 能耐受的最大 NaCl 盐浓度为 11%。

### 2.2 菌株 ZH60 与田菁胶混合浸种对玉米耐盐性的影响

#### 2.2.1 混合浸种对玉米发芽势的影响

田菁胶、内生贝莱斯芽孢杆菌 ZH60 单独浸种后的玉米发芽势高于对照组(图 2)。其中无

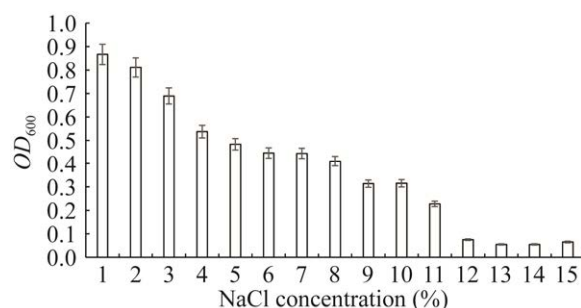


图 1 菌株 ZH60 的耐盐性

Figure 1 Salt tolerance of strain ZH60.

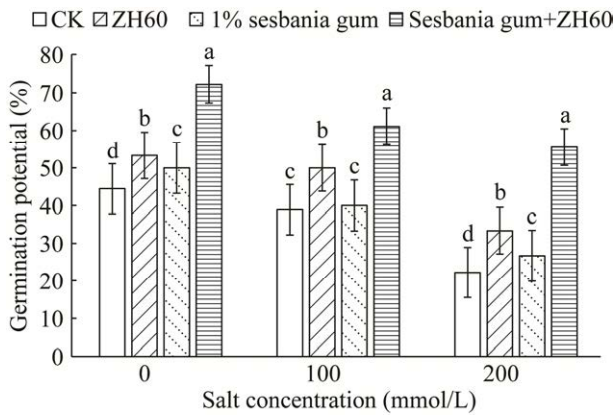


图 2 不同盐分浓度下菌株 ZH60、田菁胶单独浸种与混合浸种玉米发芽势 不同小写字母表示差异显著

Figure 2 Germination potential of maize seeds soaked with strain ZH60, sesbania gum and ZH60+sesbania gum under different salt concentrations, respectively. Different lowercase letters indicate a significant difference.

盐条件下田菁胶、ZH60 菌液单独浸种后的发芽势分别较对照组(CK)显著提高 6%、9%，说明田菁胶与 ZH60 均能促进玉米种子的萌发。100 mmol/L NaCl 盐浓度下田菁胶、ZH60 单独浸种后的发芽势分别较对照组高 1%、11%；ZH60 单独浸种差异显著。200 mmol/L NaCl 盐浓度下田菁胶、ZH60 浸种发芽势均较对照组有显著差异，分别较对照组提高 5%和 11%。0、100、200 mmol/L NaCl 田菁胶与 ZH60 混合浸种后的发芽势均显著提高，分别较对照组提高 28%、22%、30%。综上所述，田菁胶与 ZH60 混合浸种在无盐条件下均能促进玉米种子发芽，在 100 mmol/L NaCl、200 mmol/L NaCl 盐浓度下发芽势优于对照组，混合浸种能提高玉米种子在 100 mmol/L NaCl、200 mmol/L NaCl 盐浓度下的耐盐性能。

### 2.2.2 混合浸种对玉米芽长的影响

田菁胶、ZH60 单独浸种与混合浸种均能促进种子发芽。在 0、100、200 mmol/L NaCl 下

田菁胶浸种、ZH60 浸种均显著提高了种子的发芽势(图 3)；0、100、200 mmol/L NaCl 下田菁胶浸种较对照组的芽长分别显著提高了 100%、125%、100%。ZH60 浸种较对照组分别显著提高了 50%、32.5%、33.3%。0、100、200 mmol/L NaCl 下田菁胶与 ZH60 混合浸种均较对照组显著提高了种子芽长，其中 0 mmol/L NaCl 下较对照组芽长提高了 158%，100、200 mmol/L NaCl 下较对照组芽长提高了 163%、150%。田菁胶与 ZH60 浸种玉米对玉米的芽长生长均具有促进作用，同时能够提高玉米种子在中度、重度盐条件下生芽，两者混合施用时效果显著。

### 2.2.3 混合浸种对玉米根长的影响

三种盐浓度下，田菁胶、ZH60 单独浸种与混合浸种对玉米的根长具有促进作用(图 4)。在 0 mmol/L NaCl 下田菁胶浸种较对照组根长显著提高 11.9%；ZH60 浸种较对照组根长提高了 7.1%，无显著差异；田菁胶与 ZH60 混合浸种后根长较对照组提高了 36.8%，差异显著。在 100 mmol/L NaCl 下田菁胶、ZH60 以及混合浸种分别较对照组根长高 14.3%、7.1%和 21.4%；混合浸种玉米根长较对照组差异显著。

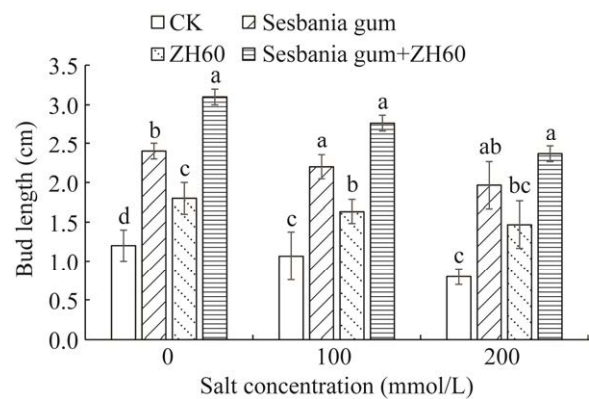


图 3 不同盐分浓度下菌株 ZH60、田菁胶单独浸种与混合浸种玉米芽长

Figure 3 Bud length of maize seeds soaked with strain ZH60, sesbania gum and ZH60+sesbania gum under different salt concentrations, respectively.

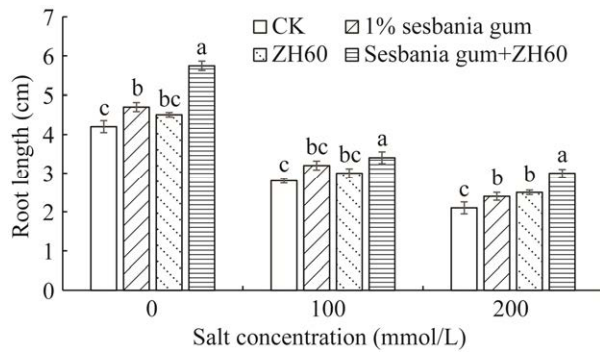


图4 不同盐分浓度下菌株 ZH60、田菁胶单独浸种与混合浸种玉米根长

Figure 4 Root lengths of maize seeds soaked with strain ZH60, sesbania gum and ZH60+sesbania gum under different salt concentrations, respectively.

在 200 mmol/L NaCl 下田菁胶、ZH60、混合浸种均较对照组根长差异显著提高，混合浸种较对照组根长提高了 42.9%。200 mmol/L NaCl 下混合浸种对玉米根长的促进效果最明显，混合浸种在高盐浓度下显著提高了玉米的耐盐性。

### 2.3 ZH60 在玉米上的定殖

图 5 为 ZH60-GFP 灌根 28 d 玉米生长状况，可以看出灌根组的玉米株高、茎粗等表型明显优于未灌根处理组，相同时间内，未用 ZH60 灌根组玉米叶片数 2-3 片，灌根处理后玉米叶片数 4 片左右，标记菌株 ZH60 显著促进玉米株高(图 6)、茎粗、叶片数，缩短了玉米生长期。其中对照组株高平均值为 23.2 cm，ZH60-GFP 灌根处理组的株高平均值为 33.6 cm，ZH60-GFP 处理显著提高了玉米株高，较对照组提高了 44.8%。

#### 2.3.1 ZH60-GFP 定殖部位

图 7 为激光共聚焦显微镜下 ZH60-GFP 菌液灌根后的玉米根部纵切图，可以看出玉米根部伸长区和根中段均有绿色荧光连续分布。田菁内生菌能够定殖于异源植株玉米根部，随时间的推移由根尖向上迁移，然而未在茎叶中发

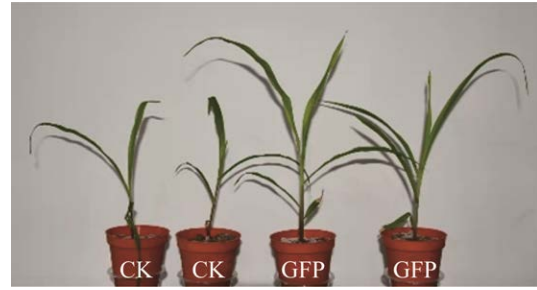


图5 ZH60-GFP 灌根 28 d 的玉米生长状况

Figure 5 Growth status of maize plants after root irrigation with ZH60-GFP for 28 days.

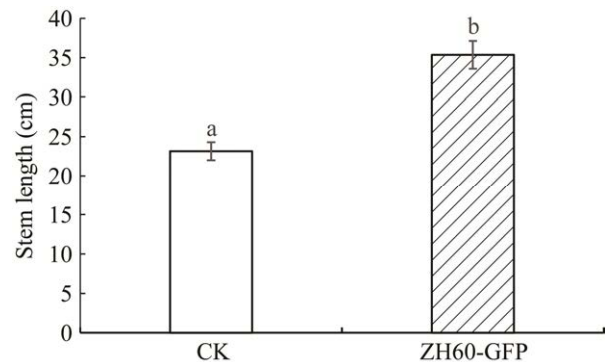


图6 ZH60-GFP 灌根 28 d 的玉米株高

Figure 6 Plant height of maize after 28 days root irrigation with ZH60-GFP.

现绿色荧光，可能是时间较短还未迁移至茎、叶部位。

#### 2.3.2 定殖量与时间的关系

植物吸收养分主要来源于根部，因此对玉米植物进行 ZH60-GFP 在根部定量表达实验。图 7D 为 ZH60-GFP 对玉米灌根后第 1、5、17、25 天根系研磨平板菌落计数折线统计图，第 1 天  $2 \times 10^4$  CFU/g、第 5 天  $1 \times 10^4$  CFU/g、第 17 天  $2 \times 10^4$  CFU/g、第 25 天  $2.5 \times 10^4$  CFU/g，可以看出，玉米根系对田菁内生菌的定殖量随时间的变化呈现出先降低后升高的趋势，在测定时间内的第 25 天达到  $2.5 \times 10^4$  CFU/g。在实验期内，内生菌 ZH60 在玉米上的定殖表现出良好的稳定性。

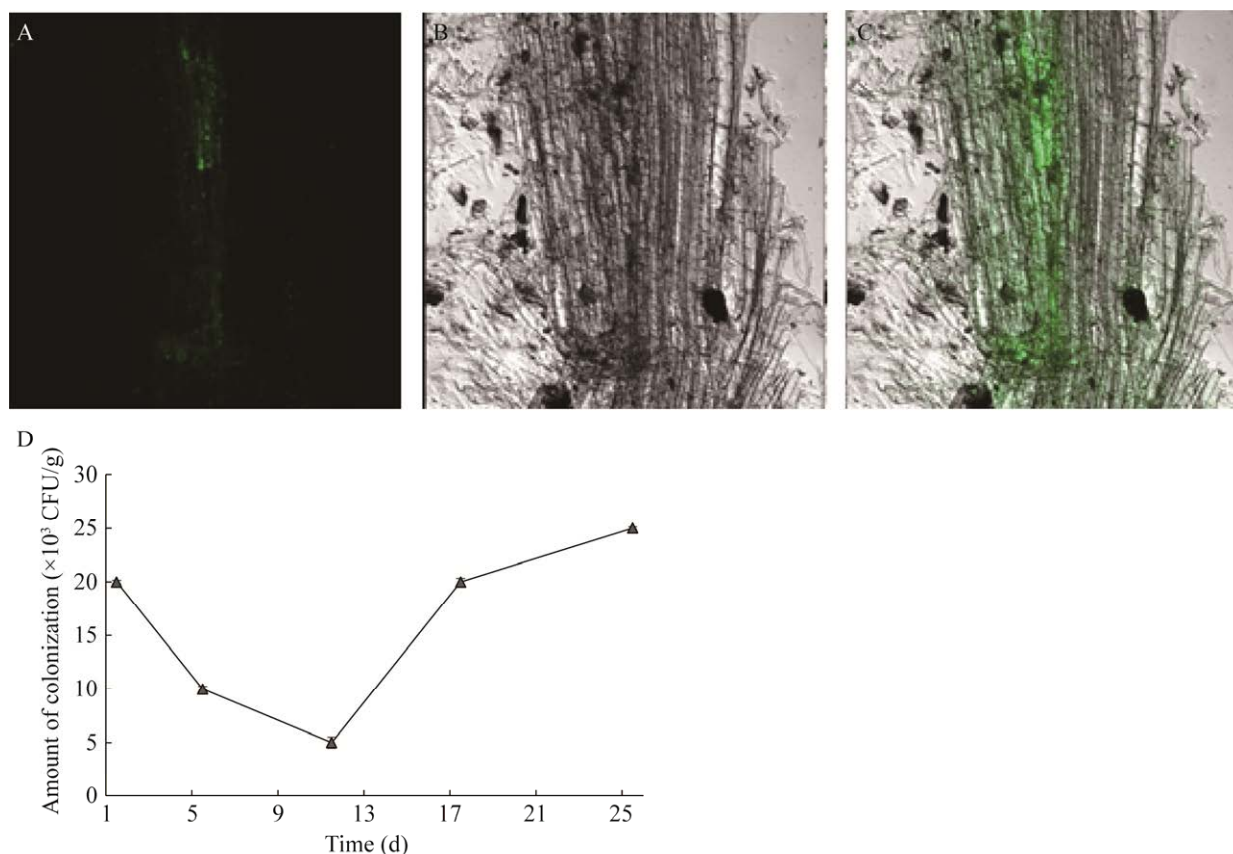


图7 ZH60-GFP在玉米根部的定殖 A: 488 nm. B: 明场. C: AB重叠. D: 定殖量

Figure 7 ZH60-GFP in maize roots. A: 488 nm. B: Open field. C: AB overlap. D: Variation of colonization.

### 3 讨论与结论

#### 3.1 多糖对植物的促生作用

多糖是构成碳水化合物主要成分,因其高效、经济、无毒、生物相容性和可生物降解性广泛应用于食品、食品包装、药物输送、组织工程、伤口敷料、废水处理和生物修复等领域<sup>[19]</sup>。田菁胶粉末是从田菁种子内胚乳提取的一种天然、亲水环境友好型半乳甘露聚糖<sup>[20]</sup>,由于田菁胶中含有大量半乳糖、甘露糖,是一种天然高分子植物性多糖,具有良好的成膜性、吸湿保水性<sup>[12]</sup>,作为一种能源物质为微生物提供其生长所需碳源。有研究表明,田菁胶水溶液具有较强的稳定性,质量分数1%的田菁胶水

溶液黏度约为1 000 mPa·s,并且随着质量分数的增加黏度增大,出现机械不溶现象<sup>[21]</sup>。本研究中菌株ZH60、田菁胶分别单独浸种玉米种子,在不同的盐浓度下均能提高玉米种子的发芽势以及根、芽长,但混合施用效果更佳。邢艺凡以壳聚糖为高粱种衣剂,探究壳聚糖对高粱的耐盐效果,结果表明其显著提高了高粱的发芽率、根长及株高<sup>[22]</sup>。Turk<sup>[23]</sup>研究的壳聚糖喷施玉米叶面,在一定程度上缓解了盐胁迫对玉米生长的不利影响,提高了盐胁迫下的玉米根长、株高以及抗氧化活性等指标。Liu等<sup>[24]</sup>研究发现,相对分子量40.8 kDa的多糖能提高水稻的耐盐性,主要表现在发芽势、发芽指数、地上部以及根长等明显优于未用海藻多糖浸种

处理的水稻。前人的研究多是利用多糖单独对种子、植株等处理探究其耐盐促生效果,而本研究将田菁胶作为一种多糖与微生物相结合,利用微生物的耐盐性以及田菁胶的营养及保护性能,保证内生菌 ZH60 能在植株生长阶段发挥效能,为实现盐碱地种植优质高产的玉米提供可能。

### 3.2 内生菌促生耐盐性能

盐胁迫影响着植物从发芽到成熟的各个方面,随着时间的增长,盐离子浓度不断累积造成植株初级盐胁迫,如离子胁迫、渗透胁迫,进而引起氧化损伤、破坏脂质导致营养失衡等损伤<sup>[25]</sup>。植物内生菌寄生在植物不同组织内部,与植物共同进化、相互作用<sup>[26]</sup>,通过固氮、溶磷、产铁载体、分泌吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)、赤霉素(gibberellin, GAs)、细胞分裂素(cytokinin, CTK)、产脱氨酶等来产生与宿主功能类似的化合物以适应不利的生态环境,从而促进植物生长<sup>[27]</sup>。例如,白建飞等<sup>[28]</sup>分离出的具有分泌吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)、产铁载体、解磷的内生菌株莫拉维假单胞菌 GF-55 使玉米根长提升 141.68%、鲜重提升 231.25%。本研究中的内生菌是从固氮草本植物田菁种子内分离出的贝莱斯芽孢杆菌 ZH60,具有解无机磷、分泌 IAA 的能力。ZH60 浸种后的玉米其根长在无盐、100 mmol/L NaCl、200 mmol/L NaCl 盐浓度下分别提高了 36.8%、21.4%、42.9%。Dong 等<sup>[1]</sup>从盐生植物中分离出的内生放线菌,在 150 mmol/L NaCl 盐浓度下均促进拟南芥的生长,同时盐胁迫下拟南芥的耐盐基因和钾离子吸收基因均上调。本研究中的 ZH60-GFP 灌根 28 d 的玉米植株株高、茎粗等表型明显优于对照组,表明 ZH60 对于植物的生长具有促进作用,但还需进行基因层面的实验探究。

### 3.3 内生菌在植物体内的定殖

内生菌利用植物根系皮层伤口或缝隙等途径进入植物体内,也存在于维管系统、薄壁组织、表皮内部,通过迁移定殖于根、茎、叶、花、果实等器官中<sup>[29]</sup>。例如,固氮根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans*)利用侧根基部及皮层细胞间的裂缝进入植物体内定殖<sup>[30]</sup>。内生菌的定殖受多种因素影响,主要包括菌株自身遗传特性(鞭毛运动方式等)、受体植株种类(选择性招募)、定殖条件(土壤性质等)、根际分泌物(丰富的生物信号分子)<sup>[31]</sup>,根际分泌物还含有丰富的营养物质和水,招募或识别包括内生菌在内的友好微生物<sup>[32]</sup>。本研究从耐盐的田菁种子中筛选出耐盐促生的内生菌——贝莱斯芽孢杆菌 ZH60,通过化学转化法进行荧光标记,将带有绿色荧光质粒(GFP)的田菁种子内生菌(ZH60-GFP)与未进行荧光标记的内生菌(ZH60)进行生长曲线的对比,发现二者生长趋势接近一致。因此,第 1、5、17、25 天对带有(GFP)标记定殖的玉米根部进行研磨,通过平板菌落计数根部定殖菌株数目,发现根部内生菌随时间动态变化,呈现出先下降又升高的趋势,这与初少华<sup>[18]</sup>在荧光标记重组菌株在玉米幼苗根际的定殖量对土壤硝酸盐含量的响应研究的结果一致。焦蓉等<sup>[33]</sup>在内生菌 YN201728 定殖动态变化中的研究用 YN201728-GFP 标记烟草植株,第 1 天在烟草的根部检测出标记的菌落数为  $6.00 \times 10^5$  CFU/g; Feng 等<sup>[34]</sup>从毒死蜱处理的水稻中分离出 5 株内生菌定殖水稻中,定殖菌株数量在  $1.07 \times 10^2$ – $6.80 \times 10^4$  CFU/g,在定殖第 7 天时达到最大值  $6.80 \times 10^4$  CFU/g。本实验中的内生菌 ZH60 在玉米上的定殖数量为  $1 \times 10^4$ – $2.5 \times 10^4$  CFU/g,在第 25 天时定殖量达到最大值,可能是由于水稻植株与玉米植株的生理特性、结构差异所致。



本研究采用的田菁种子内生菌 ZH60 具有较强的耐盐能力, 并能在玉米根部有效定殖, 利用田菁胶与田菁内生菌 ZH60 混合浸种时, 玉米种子的发芽势、根长、芽长在无盐、中盐、重盐条件下均有显著提高, 其促生耐盐性状主要来源于内生菌在根部的定殖。本研究结果为治理改良盐渍土, 提高作物在盐渍土上出芽、生根效果提供了理论数据支撑。

## REFERENCES

- [1] DONG ZY, RAO MPN, WANG HF, FANG BZ, LIU YH, LI L, XIAO M, LI WJ. Transcriptomic analysis of two endophytes involved in enhancing salt stress ability of *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 686: 107-117.
- [2] 黄晶, 孔亚丽, 徐青山, 朱春权, 朱练峰, 曹小闯, 洪小智, 张均华. 盐渍土壤特征及改良措施研究进展[J]. *土壤*, 2022, 54(1): 18-23.
- HUANG J, KONG YL, XU QS, ZHU CQ, ZHU LF, CAO XC, HONG XZ, ZHANG JH. Progresses for characteristics and amelioration measures of saline soil[J]. *Soils*, 2022, 54(1): 18-23 (in Chinese).
- [3] SHRIVASTAVA P, KUMAR R. Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2015, 22(2): 123-131.
- [4] 王颖, 刘会玲, 崔江慧, 吉艳芝, 李骁腾, 王磊, 王树涛. 环渤海地区盐渍土养分及盐离子分布特征[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(1): 344-348, 356.
- WANG Y, LIU HL, CUI JH, JI YZ, LI XT, WANG L, WANG ST. Distribution characteristics of nutrients and salt ions in saline soil around Bohai Sea[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2016, 44(1): 344-348, 356 (in Chinese).
- [5] ZHAO CZ, ZHANG H, SONG CP, ZHU JK, SHABALA S. Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity[J]. *The Innovation*, 2020, 1(1): 100017.
- [6] AHMAD M, ZAHIR ZA, ASGHAR HN, ASGHAR M. Inducing salt tolerance in mung bean thro  $\mu$ g coinoculation with rhizobia and plant-growth-promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, 57(7): 578-589.
- [7] 王颜波, 邓梦颖, 柳俊华, 邓凌帆, 张建强, 刘苗苗, 金志农. 樟树根际和内生细菌群落结构差异研究[J]. *南昌工程学院学报*, 2022, 41(1): 78-82.
- WANG YB, DENG MY, LIU JH, DENG LF, ZHANG JQ, LIU MM, JIN ZN. Structural variability in rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of *Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl[J]. *Journal of Nanchang Institute of Technology*, 2022, 41(1): 78-82 (in Chinese).
- [8] BULGARELLI D, SCHLAEPPI K, SPAEPEN S, VER LOREN van THEMAAT E, SCHULZE-LEFERT P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 807-838.
- [9] 杨雪梅, 苟攀宁, 张云翔, 陆雪兰, 贺艳婷, 田小卫. 车前子内生细菌的分离、鉴定及生防作用研究[J]. *天津农学院学报*, 2021, 28(3): 37-41.
- YANG XM, GOU PN, ZHANG YX, LU XL, HE YT, TIAN XW. Isolation, identification and biocontrol effect of endophytic bacteria in medicinal plant *Plantago asiatica*[J]. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2021, 28(3): 37-41 (in Chinese).
- [10] 张玮川, 李剑, 王志宇, 杨航, 刘庆辉, 李艳, 严文浩. 内生菌-植物联合修复污染土壤研究进展[J]. *农业资源与环境学报*, 2021, 38(3): 355-364.
- ZHANG WC, LI J, WANG ZY, YANG H, LIU QH, LI Y, YAN WH. Research progress on remediation of pollutants in soil using plant-endophyte associations[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2021, 38(3): 355-364 (in Chinese).
- [11] 王吉永, 郭龙妹, 高林怡, 王莉莉, 黎万奎. 植物内生菌的侵染定殖研究概况[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(14): 36-39.
- WANG JY, GUO LM, GAO LY, WANG LL, LI WK. Study overview on infection and colonization of plant endophytes[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(14): 36-39 (in Chinese).
- [12] 张青, 苏桂仙, 李德玲, 陈慧, 张炳焯. 田菁胶为还原剂和稳定剂制备金纳米粒子[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2018, 51(3): 98-102.
- ZHANG Q, SU GX, LI DL, CHEN H, ZHANG BZ. Preparation of Au nanoparticles with *Sesbania* gum as a reducing and stabilizing reagent[J]. *Nankai Journal (Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis)*, 2018, 51(3): 98-102 (in Chinese).
- [13] 薛蔓, 王凯, 崔元臣.  $H_2O_2$  对田菁胶的氧化降解性能研究[J]. *应用化工*, 2009, 38(11): 1642-1644.
- XUE M, WANG K, CUI YC. Oxidative degradation of sesbania gum caused by  $H_2O_2$ [J]. *Applied Chemical*

- Industry, 2009, 38(11): 1642-1644 (in Chinese).
- [14] LI R, CHENG YQ, TANG N, WU LL, NIRASAWA S, JIA X, CAO WD. Rheological, structural and physicochemical characteristics of heat-induced egg albumin/sesbania gum mixed gels[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 163: 87-95.
- [15] TANG HB, LIU YH, LI YP, LI Q, LIU XJ. Hydroxypropylation of cross-linked sesbania gum, characterization and properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 152: 1010-1019.
- [16] DONG XY, TU C, XIE ZH, LUO YM, ZHANG L, LI ZY. The genome of *Bacillus velezensis* SC60 provides evidence for its plant probiotic effects[J]. Microorganisms, 2022, 10(4): 767.
- [17] 王艳霞, 解志红, 张蕾, 常大勇. 田菁根际促生菌的筛选及其促生耐盐效果[J]. 微生物学报, 2020, 60(5): 1023-1035.  
WANG YX, XIE ZH, ZHANG L, CHANG DY. Screening of plant growth promoting and salt tolerant rhizobacteria in *Sesbania cannabina*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(5): 1023-1035 (in Chinese).
- [18] 初少华. 巨大芽孢杆菌对次生盐渍化土壤硝酸盐的转化途径及其机理研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2019.  
CHU SH. Study on nitrate reduction pathway and mechanism of secondary salinization soil by *Bacillus megaterium*[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2019 (in Chinese).
- [19] MAHMOUD YAG, EL-NAGGAR ME, ABDEL-MEGEED A, EL-NEWEHY M. Recent advancements in microbial polysaccharides: synthesis and applications[J]. Polymers, 2021, 13(23): 4136.
- [20] 罗彤彤, 张海龙. 绿色天然植物豆胶粉型催化剂载体助挤剂加工工艺研究[J]. 精细与专用化学品, 2022, 30(1): 38-41.  
LUO TT, ZHANG HL. Study on processing technology of green natural plant gum catalyst carrier extruding agent[J]. Fine and Specialty Chemicals, 2022, 30(1): 38-41 (in Chinese).
- [21] 李睿, 贾鑫, 王晨, 彭媛媛, 张雯婧, 程永强. 田菁胶的改性和应用的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(7): 52-55, 20.  
LI R, JIA X, WANG C, PENG YY, ZHANG WJ, CHENG YQ. Research advancement on modifications and applications of *Sesbania* gum[J]. Food and Nutrition in China, 2019, 25(7): 52-55, 20 (in Chinese).
- [22] 邢艺凡. 高粱耐盐种衣剂的研制及其生理作用解析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2020.  
XING YF. Research and development of seed coating agent for promoting germination in *Sorghum* under salt stress and analysis of its physiological function[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [23] TURK H. Chitosan-induced enhanced expression and activation of alternative oxidase confer tolerance to salt stress in maize seedlings[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 141: 415-422.
- [24] LIU H, CHEN XL, SONG L, LI KC, ZHANG XQ, LIU S, QIN YK, LI PC. Polysaccharides from *Grateloupia filicina* enhance tolerance of rice seeds (*Oryza sativa* L.) under salt stress[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 124: 1197-1204.
- [25] 邢起铭, 金文杰, 周利斌, 李文建, 刘瑞媛, 马建忠. 植物根际促生菌提高植物耐盐性的研究进展[J]. 中国农学通报, 2022, 38(11): 46-52.  
XING QM, JIN WJ, ZHOU LB, LI WJ, LIU RY, MA JZ. Salt tolerance of plant increased by plant growth promoting rhizobacteria: research progress[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(11): 46-52 (in Chinese).
- [26] PARVANDI M, REZADOOST H, FARZANEH M. Introducing *Alternaria tenuissima* SBUp1, as an endophytic fungus of *Ferula assa-foetida* from Iran, which is a rich source of rosmarinic acid[J]. Letters in Applied Microbiology, 2021, 73(5): 569-578.
- [27] SHAH AA, LIU ZW, QIAN C, WU JZ, ZHONG XX, KALSOOM UE. Effect of endophytic *Bacillus megaterium* colonization on structure strengthening, microbial community, chemical composition and stabilization properties of hybrid *Pennisetum*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(3): 1164-1173.
- [28] 白建飞, 韩升才, 高聚林, 于晓芳, 青格尔, 胡树平, 张赛楠, 郭江岸. 内生菌莫拉维假单胞菌 GF-55 促进玉米生长和提高抗倒伏功能分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2625-2637.  
BAI JF, HAN SC, GAO JL, YU XF, QING GE, HU SP, ZHANG SN, GUO JA. Endophytic bacterial strain GF-55 improves the growth and lodging resistance of maize[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2625-2637 (in Chinese).
- [29] COMPANT S, CAMBON MC, VACHER C, MITTER B, SAMAD A, SESSITSCH A. The plant endosphere world-bacterial life within plants[J]. Environmental

- Microbiology, 2021, 23(4): 1812-1829.
- [30] WALKER L, LAGUNAS B, GIFFORD ML. Determinants of host range specificity in legume-rhizobia symbiosis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 585749.
- [31] 张妃, 冯乃宪, 宾慧, 李彦文, 赵海明, 向垒, 蔡全英, 莫测辉. 内生菌定殖、促生及降低作物有机污染的机理研究(I): 定殖与促生[J]. *农业环境科学学报*, 2022, 41(8): 1619-1628.
- ZHANG F, FENG NX, BIN H, LI YW, ZHAO HM, XIANG L, CAI QY, MO CH. Research advances in colonization of endophytes and their role in promoting plant growth and minimizing organic pollution in crop plants: part I: colonization and plant growth promotion[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(8): 1619-1628 (in Chinese).
- [32] KHARE E, MISHRA J, ARORA NK. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2732.
- [33] 焦蓉, 何鹏飞, 王戈, 吴毅歆, 王军伟, 唐萍, 杨焕文, 何月秋. 内生菌 YN201728 的定殖能力及其防治烟草白粉病的效果研究[J]. *核农学报*, 2020, 34(4): 721-728.
- JIAO R, HE PF, WANG G, WU YX, WANG JW, TANG P, YANG HW, HE YQ. Colonization and control effect on tobacco powdery mildew of endophyte YN201728[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, 34(4): 721-728 (in Chinese).
- [34] FENG FY, GE J, LI YS, HE S, ZHONG JF, LIU XJ, YU XY. Enhanced degradation of chlorpyrifos in rice (*Oryza sativa* L.) by five strains of endophytic bacteria and their plant growth promotional ability[J]. *Chemosphere*, 2017, 184: 505-513.