

紫穗槐种子内生根瘤菌数量分布与种类特征

陈利云¹, 周志宇²

(1. 天水师范学院生命科学与化学学院, 甘肃 天水 741000; 2. 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020)

摘要: 为探明根瘤菌在植物种子内的分布规律和种类特征, 对紫穗槐种子荚果皮、种皮、子叶和胚芽 4 个部位内生根瘤菌的分布数量与菌株种类进行了研究。结果表明: 内生根瘤菌在紫穗槐种子不同部位数量分布有很大差异, 以种皮最丰 (6.663×10^6 cfu/pod), 占种子内生根瘤菌总数的 50%, 荚果皮次之 (3.335×10^6 cfu/pod), 子叶和胚芽内仅有少量分布 (2.087×10^5 cfu/pod, 1.250×10^6 cfu/pod)。分离纯化的 32 株根瘤菌 RAPD 检测图谱显示为 5 个不同类型, 以 B 型图谱菌株数目最多, 为 13 株, 占菌株总数的 40.62%, C 型菌株 8 株, D、A 和 E 型图谱菌株分别为 6、4 株和 1 株, 其中种皮 16 个菌株电泳图谱为 5 种, 荚果皮 8 个菌株分为 3 种, 子叶和胚芽 8 个菌株电泳图谱共 3 种, 显示了紫穗槐种子内生根瘤菌分布部位选择的偏向性与种类特征的多样性。

关键词: 紫穗槐种子; 内生根瘤菌; 数量分布; 种类特征

中图分类号: Q948.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2012)04-0231-05

植物内生菌是一类能在植物组织中定殖、运转并稳定生存的微生物, 它能与宿主植物协同进化形成稳定的生态关系^[1-2]。感染内生菌的植物宿主往往具有生长快速、抗逆境、抗病害等优势, 比未感染内生菌的植株更具生存竞争力。根瘤菌是一类发现较早研究深入的有益植物内生菌, 它能与豆科植物形成共生关系并分布于植物体的各个部位, 不仅具有固氮、溶解无机磷和分泌生长素的作用^[3-6], 还能与菌根真菌、氢氧化细菌等土壤有益微生物相互影响、相互联合共同促进宿主植物的生长^[7-10], 这些特征对增加农作物产量、提高土壤肥力有明显的的作用, 因此深入研究根瘤菌的固氮机理, 充分应用其促生作用对农业的可持续发展和生态环境的改善具有深远的意义。在自然界进入新土壤环境中的根瘤菌主要通过植物种子携带, 种子是被子植物的繁殖器官, 与其共生的根瘤菌是在长期的自然选择过程中与种子协同进化的产物, 在与宿主植物构建共生固氮体系中要比土壤中其他根瘤菌具有更强的竞争力, 而建立稳定共生关系具有的竞争力是生产中研制根瘤菌接种菌剂的必要条件之一。能否在种子内生根瘤菌中筛选出结瘤竞争力强大又具有高效固氮效率的根瘤菌株, 对根瘤菌接种菌剂在土壤中的定殖及各种促生作用的发挥意义重大。实验以紫穗槐种子为材料研究了种子内生根瘤菌在种子不同生态位的数量分布比例及种类特征, 目的是为种子内生

根瘤菌的合理利用与深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 采样地概况

采样地位于甘肃省天水市 (东经 $105^{\circ}41'$, 北纬 $34^{\circ}14'$) 干旱荒山, 海拔 1 085 ~ 1 100 m, 年均日照 2 010 h, 年均气温 11°C , 年均降水量 660 mm, 年均蒸发量 952 mm, 无霜期 180 d, 土壤类型为黄棕壤, 属大陆性温带半湿润型气候, 采样时间 2009 年 11 月初。

1.2 试剂

所需试剂及引物均购于上海生工生物工程技术有限公司。

1.3 种子处理

挑选健康饱满的紫穗槐种子适量, 用 40°C 温水浸种 24 h 后, 95% 乙醇处理 5 min, 0.1% 升汞浸泡 30 s, 无菌水冲洗 7 ~ 8 次, 在无菌状态下将 20 粒种子解剖为荚果皮、种皮、子叶和胚芽四部分备用。

1.4 菌种分离与鉴定

将处理好的种子各部分入灭菌研钵中加 2 ml 无菌水充分研磨, 离心 ($4\ 000\ \text{r/min}$, 10 min) 后取上清液 1 ml 配制成 10^{-2} ~ 10^{-7} 浓度稀释液 (1 ml 上清液加 9 ml 无菌水菌液浓度为 10^{-1}), 各浓度分别取 60、80、100 μl 无菌状态下接种于 YMA 刚果红培养基 (配方: K_2HPO_4 0.5 g/L, 酵母粉 1 g/L, NaCl 0.1 g/L,

收稿日期: 2011-10-12

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2007BAD80B05); 国家自然科学基金资助项目 (30800801)

作者简介: 陈利云 (1974—), 女, 甘肃天水人, 硕士, 讲师, 主要从事生态学教学与研究。E-mail: chenliy06@sina.com。

MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, 甘露醇 10 g/L, 琼脂 15 g/L, 0.5% 刚果红液 4 ml, 蒸馏水 1 000 ml, pH 值 7.0 ~ 7.2), 28℃ 培养, 相同条件设置对照, 3 个重复。筛选同一浓度相同接种量各部位单菌落分布均匀清晰的平板, 6 天后记录单菌落数量, 进行革兰氏染色及形态学镜检区分^[11]。选择菌落均匀、约每平板 1 ~ 30 个菌落的稀释度计算每处理组织中内生根瘤菌的最大可能菌株数^[12], 初步鉴别确定为根瘤菌后 4℃ 保存。

1.5 接种与菌种基因组 DNA 提取

挑取平板上单菌落(浓度 10⁻⁶接种量 80 μl)接种于装有 15 ml YMB(YMA 培养基不加琼脂)液体培养基的 50 ml 锥形瓶, 28℃ 震荡培养 6 d, 相同条件设置对照, 4 个重复。将培养好的菌液分为两等分, 一份接种于株高 5 cm 的紫穗槐幼苗根部用于菌种鉴定。另一份用于基因组 DNA 的提取^[13], 获得的 DNA 沉淀溶于缓冲液(100 μl × TE), 电泳检测、分光光度计测定其浓度和纯度后 -20℃ 保存备用。

1.6 引物筛选

20 μl 反应体系采用何庆元优化的反应设计^[14], 反应程序见文献^[15], 对 35 条随机引物进行筛选。

1.7 根瘤菌基因组 DNA 的 RAPD 检测

用 Eppendorf AG22331 型 PCR 仪对 32 个根瘤菌基因组 DNA 进行扩增, 随机引物 S177, 20 μl 反应体系和反应程序如上, 获得的 PCR 产物 4℃ 保存, 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 用 AlphamagerT 502643 型凝胶成像系统拍照分析。

2 结果与分析

2.1 根瘤菌的形态特征及接种

接种液在 YMA 培养基上 6 d 可形成直径 0.4 ~ 0.5 cm 的圆形菌落, 在刚果红 YMA 培养基上不吸色, 菌落乳白色表面凸起光滑, 边缘整齐, 属于中慢生型根瘤菌, 光学显微镜观察为短杆状的革兰氏阴性细菌。接种 50 d 后, 植株结瘤与对照相比显著增加, 可判断从紫穗槐种子各部位分离出的 32 个菌株为中慢生型根瘤菌。

2.2 单菌落筛选

菌液浓度 10⁻² ~ 10⁻⁴ 接种量为 60 μl、80 μl 和 100 μl 培养 6 d 后, 各平板上没有清晰的单菌落出现, 各单菌落粘连在一起无法清楚计数。10⁻⁵ ~ 10⁻⁷ 浓度时, 平板培养出现单菌落, 以浓度 10⁻⁶ 平板单菌落为多且清晰(表 1), 其中接种量 80 μl 时的单菌落最为典型, 无单菌落粘连现象, 易于菌株数目

记录和菌落形态的鉴别。

表 1 菌液稀释度为 10⁻⁶ 时平均每平板单菌落数

Table 1 The number of single colony on flat with concentration in 10⁻⁶

接种量(μl) Inoculation quantity	种皮 Seed capsule	果皮 Legumen skin	子叶 Cotyledon	胚芽 Embryo
60	4.667	2.000	1.000	0.667
80	5.333	2.333	1.667	1.333
100	—	2.667	1.667	1.333

注: “—” 表示平板单菌落粘连无法准确计数。

Note: “—” indicates not taking count of single colony for conglutination.

2.3 紫穗槐种子不同部位根瘤菌数量分布

以浓度 10⁻⁶ 接种量 80 μl 平板单菌落数目为计数标准, 经平板培养共分离出 32 个典型的根瘤菌单菌落(如表 1, 图 1), 其中种皮为 16 个, 占种子根瘤菌总数的 50%, 平均每平板 5.667 个单菌落, 荚果皮为 8 个, 为总数的 25%, 子叶和胚芽分别 5 个和 3 个, 分别占 16% 和 9%。

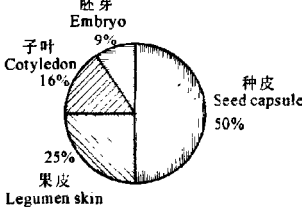


图 1 种子不同部位根瘤菌分布比例

Fig.1 Distribution of rhizobium in different parts of seed

2.4 引物筛选结果

电泳检测结果显示 35 条引物中有 S1、S42、S164、S177、S344 和 S502 引物均能扩增出片段, 对 6 条引物进一步检测表明, 有 2 条都能在 32 个菌株中扩增出片段, 其中以 S177 引物扩增 DNA 片段丰富, 扩增图谱清晰, 稳定性高、重复性好, 可用于分子标记和遗传分析(见表 2)。

2.5 菌株 RAPD 检测图谱

如图 2 显示, 分离纯化的 32 个菌株 RAPD 检测图谱显示扩增条带为 5 个类型, 以 B 型菌株数目最多, 为 13 株, 占菌株总数的 40.62%, C 型菌株 8 株, 占菌株总数的 25%, D、A 和 E 型条带数目分别为 6、4 条和 1 条。分离于种皮的 16 个菌株扩增有 5 个类型的条带, 以 B 型菌株数目最多, 荚果皮中 8 个菌株共有 3 个类型的图谱条带, 其中 C 型条带最多, 占 50%, 子叶和胚芽共出现 3 种图谱, 荚果皮、子叶和

胚芽中的菌株图谱与种皮菌株图谱类型一致。

表 2 引物筛选的结果

Table 2 The results of primer screening

序号 Serial NO.	引物 Primer	序列 Sequence	序号 Serial NO.	引物 Primer	序列 Sequence	序号 Serial NO.	引物 Primer	序列 Sequence
1	S1	GTTTCGCTCC*	13	S135	CCAGTACTCC	25	S345	CTCCATGGGG
2	S6	TGCTCTGCC	14	S164	CCGCCTAGT**	26	S346	TCGTTCGC
3	S9	TGGGGGACTC	15	S177	GGTGGTGAT**	27	S347	CCTCTCGACA
4	S20	GGACCCCTTAC	16	S215	TCCGAGAGGG	28	S357	ACGCCAGTTC
5	S42	GGACCCAACC*	17	S265	GGCGGATAAG	29	S502	CACAGCTGC*
6	S64	CCGCATCTAC	18	S288	AGGCAGAGCA	30	S503	ACACAGAGGG
7	S104	GGAAGTCGCC	19	S294	GGTCGATCTG	31	S506	GTCTACGGCA
8	S124	GGTGATCAGG	20	S309	GGTCTGGTTG	32	S507	ACTGGCCTGA
9	S125	CCGAATTCCC	21	S320	CCCAGCTAGA	33	S508	CCCGTTGCCT
10	S128	GGGATATCGG	22	S341	CCCGGCATAA	34	S509	TGAGCACGAG
11	S129	CCAAGCTTCC	23	S342	CCCGTTGGGA	35	S510	CCATTCCCCA
12	S130	GGAAGCTTGG	24	S344	CCGAACACGG*			

注：“*”表示扩增效果较好的引物序列，“**”表示扩增效果最好的引物序列。
Note: “*” indicates the primer sequence having good amplification result. “**” indicates the primer sequence having best amplification result.

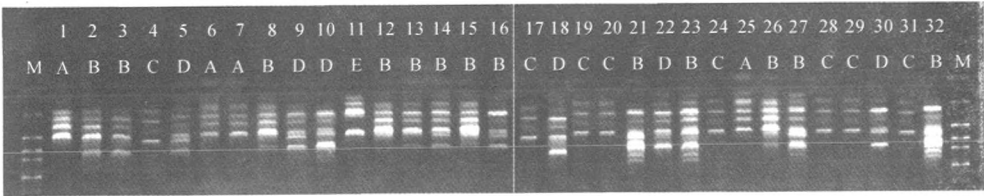


图 2 32 个根瘤菌菌株 RAPD 扩增结果

Fig.2 The amplification result of 32 strains

注:1~16 泳道菌株分离于种皮,17~24 分离于果皮,25~29 分离于子叶,30~32 分离于胚芽。相同字母表示扩增条带相同。

Note: Strains 1~16 are separated from seed capsule, 17~24 from Legumen skin, 25~29 from Cotyledon, 30~32 from embryo. Same letters indicate same amplification atlas.

3 讨论

植物体是一个由自身的活体组织和定殖在体内的内生细菌共同构成的一种复杂的微生态体系,生活在此复杂环境中的内生菌,能与植物体形成和谐或竞争的平衡体系,在协同进化的过程中由于与宿主植物亲和力的不同而在植物不同的组织中种类和数量不相同^[16]。根瘤菌是一种与宿主植物和谐共生的促生内生菌,它能穿过植物皮层进入木质部导管中,随着宿主植物的生长被运送到植物上部营养器官或繁殖器官中^[17]。种子是豆科植物的繁殖器官,它进入新的土壤环境,成为下一代植物新植株内生根瘤菌的重要来源,为豆科植物-根瘤菌共生体系的构建提供了物质基础,对次代植株的生长和土

壤环境的改善有积极作用。

实验结果显示内生根瘤菌在紫穗槐种子的不同部位数目分布差异很大,主要存在于种皮部位,占绝对的数量优势,此结果与周肇蕙^[18]的研究一致,其次是荚果皮,子叶和胚芽中只有少量分布。说明根瘤菌在种子内的分布具有对特定部位选择的偏向性,是豆科植物-根瘤菌这一共生体系长期与环境相适应的结果,说明此生态位更适合根瘤菌的生存与繁殖,袁保红和许森等的研究也显示了相似的结论^[19-20],同时由于内生根瘤菌抵抗植物病菌入侵能力的大小与其数目的相关性,种皮部位根瘤菌数目上的优势度对种皮更好地发挥保护种子的屏障作用意义重大^[21-22]。

植物体中定殖的内生菌的生长繁殖要受到宿主

基因型和环境条件的选择,这些因素决定了内生细菌的遗传多样性,在宿主植物的影响下,内生细菌的不同亚群会在宿主不同环境中形成^[23-24],不同基因型的内生菌选择不同的生态位,种子作为植物体的一部分也不例外,实验结果支持这一理论。种子不同部位根瘤菌菌种基因型各不相同,显示了种子内生根瘤菌的高度多样性,在最适宜的生态位不仅根瘤菌数目占优势,其菌种基因型也较之其他部位多,如种皮中分离出了根瘤菌 16 株,占种子根瘤菌总数 32 株的 50%,B 型图谱根瘤菌 13 株,作为优势菌株占据优势的生态位,但优势生态位并不排斥稀有种的同时存在,它们共同构成了种子微生物生态系统的生物环境。有研究表明具有不同遗传因子的植物对同一基因型内生细菌生物固氮效率的影响不同^[25],那么在同一宿主中不同基因型的内生根瘤菌是否也具有不同的固氮效率,作为优势种的 B 型根瘤菌是否会比稀有种 E 型菌株有更强的固氮效率还需要实验验证。

参考文献:

- [1] 文才艺,吴元华,田秀玲.植物内生菌研究进展及其存在的问题[J].生态学杂志,2004,23(2):86-91.
- [2] 黄瑞虎,刘会强,迪丽拜尔·托乎提.植物内生菌及其宿主植物研究概况[J].新疆师范大学学报(自然科学版),2008,27:(1):77-79.
- [3] 马其东,刘自学,洪绶曾,等.不同根系发育能力的苜蓿品种接种根瘤菌的效果[J].草业学报,1999,8(4):46-52.
- [4] 宁国赞,李元芳,刘惠琴.我国豆科牧草根瘤菌选育及应用研究的进展[J].中国草地,1989,(3):68-73.
- [5] 张志芳,张 榕.利用菌根菌提高红花草根瘤固氮能力的研究[J].草业科学,1996,13(3):45-47.
- [6] Hallmann J, Quadt - Hallmann A, Mahaffee W F, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops[J]. Microbiol, 1997,43:895-914.
- [7] Varennes a A, Gosa b M J. The tripartite symbiosis between legumes, rhizobia and indigenous mycorrhizal fungi is more efficient in undisturbed soil[J]. Soil Biol Biochem., 2007,39:2603-2607.
- [8] Pedro M, Antunes A, Amarilide V. Accumulation of specific flavonoids in soybean (*Glycine max* L. Merr.) as a function of the early tripartite symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi and *B. radicum* Japonicum (Kirchner) Jor dan[J]. Soil Bio. l Biochem., 2006,38:1234-1242.
- [9] Lekberg Y, Koide R T. Arbuscular mycorrhizal fung, rhizobia; available soil P and nodulation of groundnut (*Arachis hypogaea*) in Zimbabwe[J]. Agric. Ecosys. Environ, 2005,110:143-148.
- [10] Dong Z, Wu L, Kettlewell B. Hydrogen fertilization of soil is this a benefit of legumes in rotation[J]. Plant Cell & Environ, 2003,26:1875-1879.
- [11] 黄宝灵,吕成群,唐东阶,等.罗汉松根瘤内生细菌的分离和特性[J].微生物学报,2002,42(5):620-623.
- [12] 林稚兰,黄秀梨.现代微生物学与实验技术[M].北京:科学出版社,151-153.
- [13] W ilson K. Reparaion of genomic DNA from bacteria. Preparation of genomic from bacteria[C]// Ausubul F M, Bent R, et al. Current protocols in molecular biology. New N. Y: J. Wiley and Sons, 1987:21-212.
- [14] 何庆元,王永雄,王松华,等.根瘤菌 RAPD 引物筛选及条件优化[J].核农学报,2007,21(2):132-135.
- [15] 曾昭海,陈文新,胡跃高,等.应用 RAPD 分子标记技术研究苜蓿根瘤菌田间竞争结瘤能力[J].生态学报,2004,24(7):1341-1345.
- [16] 冯永君,宋 未.植物内生细菌[J].自然杂志,2001,23(5):249-252.
- [17] 许建香.芸豆高效根瘤菌的筛选及分子标记[D].北京:中国农业大学,2004:27-28.
- [18] 周肇萼,严 进.大豆疫病种子带菌和传病研究[J].粮食储藏,2001,30(6):3-6.
- [19] 袁保红,杜青平,邓祖军.小连翘内生真菌种群分布及其抗菌性研究[J].广东药学院校报,2007,23(3):307-311.
- [20] 许 森.内生固氮菌研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(12):4823-4828.
- [21] 龙良鲲,肖崇刚.内生细菌 01-144 在番茄根茎内定殖的初步研究[J].微生物学通报,2003,30(5):53-56.
- [22] Coombs J T, Franco C M. Visualization of an entophytic Streptomycin species in wheat seed[J]. Appall. Environ. Mi - crobial., 2003,69(7):4260-4262.
- [23] Downing K J, Thomson J A. Introduction of the *Serratia marcescens* *chiA* gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of phytopathogenic fungi[J]. Can Microbiology, 2000,46(4):363-369.
- [24] Siciliano SD, Frodin N, et al. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination[J]. Applied environment microbiology, 2001,67(6):2469-2473.
- [25] Easton H S, Latch C C, Tapper B A, et al. Ryegrass host genetic control of concentrations of endophyte-driven alkaloids[J]. Crop science, 2002,42(1):51-57.

Amount distribution and category characteristics of endogenous rhizobium in *Amorpha fruticosa* seeds

CHEN Li-yun¹, ZHOU Zhi-yu²

(1. School of Life-Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui, Gansu 741000, China;

2. College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China)

Abstract: To determine the amount distribution and category characteristics in seed capsule, pericarp, cotyledon and embryo of rhizobium in *Amorpha fruticosa* seeds, amount and category of endogenous rhizobium in different parts seed of *Amorpha fruticosa* were analyzed. The result indicated that there was significant discrepancy in amount distribution and category characteristics in endogenous rhizobium. Most endogenous rhizobia were distributed in seed capsule (6.663×10^6 cfu/pod), which accounted for 50 percent of the total strains, and then pericarp (3.335×10^6 cfu/pod). Only small amount of endogenous rhizobium was present in cotyledon and embryo (2.087×10^6 cfu/pod, 1.250×10^6 cfu/pod). 32 strains of rhizobium, isolated from different parts seed of *Amorpha fruticosa*, were divided into 5 types based on the characteristic maps of RAPD-PCR groups (A, B, C, D and E). Most of the stains were B type, accounting for 40.62% of the total. 8 strains belonged to C type, and the number of stains belonging to D, A and E types were 6, 4 and 1. There were 5 groups in seed capsule of 16 strains, 3 groups in pericarp and only 3 species of cotyledon and embryo. These showed the partiality and diversity of endogenous rhizobium in different parts of seed of *Amorpha fruticosa* with amount distribution position and category characteristics.

Keywords: seed of *Amorpha fruticosa*; endogenous rhizobium; amount distribution; category characteristics

(上接第 223 页)

Assessment of water resources carrying capacity in Yulin based on principal component analysis

XIAO Ying-ying, SONG Xiao-yu, ZHANG Jian-long

(Key Laboratory for Northwest Water Resources and Ecological Environment of Ministry of Education,

Xi'an University of Technology, Xi'an, Shaanxi 710048, China)

Abstract: This paper established an evaluation index system with nine indicators, such as water quantity per capita, water resources development and utilization level, COD concentration, per capita grain possession, water consumption per capita, natural growth rate of population, per capita GDP, water-use efficiency and environmental water use rate. A comprehensive evaluation of water resources carrying capacity in Yulin was carried out by principal component analysis, through which four principal components were given. The results show that: water resources carrying capacity is in unbalanced distribution in Yulin and the comprehensive evaluation value is different. The comprehensive evaluation values of Hengshan, Dingbian, Fugu, Yuyang and Shenmu are between 1 365.12 and 10 447.86, which are in the middle level. Water resources carrying capacity is limited in Jingbian and its comprehensive evaluation value is 10 468.962 ($> 10 447.86$), which is slightly larger than Grade I standard. In other divisions, such as Zizhou, Jiaxian, Qingjian, Suide, Mizhi and Wubu, they have a great exploitation potentiality and their evaluating values are lower than 1 365.12, the Grade III standard. At last countermeasures are proposed to improve the water resources carrying capacity, which have important practical significance for optimizing water resources allocation and promoting sustainable development of the social economy in Yulin.

Keywords: water resources carrying capacity; principal component analysis; comprehensive assessment; Yulin