

接种红色荧光蛋白标记根瘤菌对苜蓿幼苗生长及结瘤能力的影响

杨晓玫,师尚礼,姚 拓,吕丹彤,李 琦,李 东,杨芮淇,谢华山

(甘肃农业大学 草业学院/草业生态系统教育部重点实验室/甘肃省草业工程实验室/中-美草地畜牧业可持续发展研究中心,甘肃 兰州 730070)

摘要:将含有红色荧光蛋白(RFP)基因质粒的荧光标记根瘤菌 S. LZgn5-rfp2, S. 12531-rfp4、S. LH343-rfp3 接种于甘农 5 号和 WL343HQ 紫花苜蓿,分别测定 2 个苜蓿品种幼苗的生物量、生长指标、固氮酶活性等指标。结果表明:RFP 标记根瘤菌与出发菌相比对苜蓿幼苗生长无显著影响,与不接菌的苜蓿幼苗相比有明显的促生效果,能稳定的在苜蓿幼苗体内表达,并具有与出发菌无差异的促生能力,2 个苜蓿品种间也无特异性。

关键词:根瘤菌;苜蓿;红色荧光蛋白;三亲本杂交

中图分类号:S144.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2019)04-0078-07

红色荧光蛋白(Red Fluorescent Protein, RFP)为一种发光蛋白,1999 年首次被报道^[1],其发射波长较长,最大吸收波长和最大发射波长分别为 558 nm 和 583 nm,在紫外线的照射下可直接发射红色荧光,其灵敏度比绿色荧光蛋白(GFP)及青色荧光蛋白(CFP)高,是基于 GFP 和 CFP 的一种优良稳定的荧光蛋白^[2]。利用大肠杆菌 DH5a 法和三亲本杂交法成功构建了稳定表达的 RFP 荧光标记根瘤菌^[3],适度增加了荧光资源,可对不同颜色荧光质粒蛋白同时多部位标记^[4-5]。豆科植物固氮效率的高低直接由豆科植物与根瘤菌两者之间基因的相容性决定^[6],田间接种根瘤菌后,土著根瘤菌必然会与外源根瘤菌在生长空间,土壤营养及宿主植物等方面进行竞争,其竞争能力的大小直接影响接种的根瘤菌能否正常结瘤^[7]。

目前,国内外对 RFP 质粒转入苜蓿根瘤菌的研究鲜为报道,已有 cfp 基因成功导入苜蓿根瘤菌中,并有明显的促生效果^[8]。为检测 RFP 质粒标记后的根瘤

菌能否成功侵染苜蓿根系并结瘤,将含有 RFP 质粒稳定表达的荧光标记根瘤菌接种于紫花苜蓿(*Medicago sativa*),观察导入的 rfp 质粒在苜蓿植物体内能否正常表达,并通过测定回接植株的生物量,结瘤特性和占瘤率探讨优良红色荧光标记株的荧光蛋白表达能力,为研究根瘤菌结瘤固氮能力及根瘤菌与土著菌消长竞争关系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

盆栽试验种子发芽率 90.6%、甘农 5 号和 WL343HQ 紫花苜蓿净度为 98.5%,均来自草业生态系统教育部重点实验室。

试验培养基参照袁全等^[9]的方法配制 TY(Yeast Tryptone Agar)、参照殷爱华等^[10]的方法配制 YMA 培养基,Hoagland 无氮营养液^[11]。

出发菌为课题组筛选的高效根瘤菌 *Rhizobium-meliloti* GN5 (S. LZgn5)、*Sinorhizobiummeliloti* 343 (S. LH3436),购自中国科学院微生物保藏中心的苜蓿中华根瘤菌标准菌 *Sinorhizobiummeliloti* 12531 (S. 12531)。

苜蓿幼苗接菌 RFP 基因质粒荧光标记根瘤菌菌株:S. LZgn5-rfp2, S. 12531-rfp4、S. LH343-rfp3。

收稿日期:2019-01-04; 修回日期:2019-06-28

基金项目:国家自然科学基金项目(31560666)资助

作者简介:杨晓玫(1992-),女,甘肃会宁人,在读博士生。

E-mail: yangxiaomeirz@126. com

师尚礼为通讯作者。

E-mail: 2470398455@qq. com

1.2 试验方法

1.2.1 种子表面灭菌 取出 5 粒灭菌甘农 5 号和 WL343HQ 苜蓿种子,用无菌水在灭菌三角瓶中将种子洗涤 2 次,75% 的乙醇浸泡 3 min,并用无菌水清洗 4 次。0.1% 的 HgCl_2 浸泡 3 min,清洗 4 次。为检测种子表面是否彻底灭菌,将之前的灭菌种子放于 YMA 培养基,观察有无菌长出。

1.2.2 种子发芽处理 取表面灭菌的供试品种种子均匀置于灭菌培养皿内滤纸上,加入 5 mL 无菌水 28℃ 避光培养,适时补充水分,待其发芽后选取发芽状况一致的种子备用。实验塑料杯(6 cm×7.5 cm)用 75% 乙醇处理后杯底扎眼,供给后期苜蓿的生长从下而上的营养液。高温灭菌沙培沙子 3 h,150℃ 高温持续烘干 6 h,冷却后分别装于塑料杯中,每标 250 g,分别取 20 粒发芽种子均匀放于每杯中并覆沙 20 g。

1.2.3 制备及接种菌液 分别用接种环转接苜蓿根瘤菌及荧光标记菌至 100 mL YMA 液体培养基中,28℃、120 r/min 培养,定期检测其 $D_{600\text{ nm}}$ 值,待值达到 0.5~0.8 时结束培养备用。

采用每菌株 4 次重复随机区组^[12]进行盆栽试验,并设置不接菌处理作为对照。幼苗长出第一片真叶时,开始在白色培养盘中加入 Hoagland 无氮营养液。转移已培养好的菌液至离心管离心,去上清留沉淀,加入等体积的无菌水,混合震荡,每个盆栽表面分别浇灌 20 mL。水分和营养液需在幼苗生长的整个过程中补充及时。

1.3 测定指标和方法

1.3.1 苜蓿幼苗生长指标 苜蓿幼苗生长至第 46 d,从杯中取出苜蓿幼苗及沙,冲洗干净至根系完整分开,滤纸及时吸干表面水分。

(1)直尺测量苜蓿苗的株高和根长;(2)计数不同处理苜蓿叶片数;(3)采用描形称重法^[13]测定苜蓿叶片叶面积,选取植株从下往上第二个分枝中间的叶片 3 次重复;(4)分析天平分别称量不同处理苜蓿幼苗地上鲜重和根鲜重,3 次重复并记数;称鲜重后放于烘箱 110℃ 处理 20 min,随后立即 80℃ 连续烘干 12 h 后称其干重。

1.3.2 苜蓿固氮能力指标测定 (1)测定苜蓿幼苗单株结瘤数;(2)参照李剑峰等^[14]5 分制的方法划分根瘤等级;(3)测定苜蓿幼苗根瘤固氮酶活性,采用乙炔还原法^[15];切下根系两端 0.5 cm 处根瘤,并称 0.1 g 鲜

重,放于 17 mL 西林瓶中,并放入湿润的滤纸片,盖瓶塞并密封,3 次重复处理,用微量 2 mL 无菌注射器抽出 1.7 mL 瓶内空气,并注入 1.7 mL 乙炔气体,使其终浓度为 10%。室温下反应 1 h 后,以 100 μL 进样器抽取西林瓶内气体 50 μL ,用 GC-7890F 气相色谱仪测定各处理在 1 h 内生成的乙烯气体含量(μmol),参照谭志远等^[16]的方法计算植株根瘤的固氮酶活性($\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{g})$);(4)苜蓿幼苗单株根瘤占瘤率的检测。常规方法用灭菌培养皿收集所有根瘤,用荧光显微镜观察表面灭菌的处理的苜蓿幼苗根瘤,荧光标记株侵染产生红色荧光^[17]。筛选出固氮酶活性高、占瘤率高且荧光蛋白表达能力高,同时增加苜蓿植株生物量的荧光标记菌株苜蓿幼苗。

1.3.3 测定苜蓿幼苗叶绿素含量 苜蓿幼苗叶片叶绿素含量的测定参照邹琦等^[18]的方法,为取苜蓿幼苗各处理长势甚微从上往下第 2 个分枝的苜蓿叶片,并称取 0.1 g 剪碎,放于离心管中按方法步骤测定并计算叶绿素含量。

1.4 数据分析

数据结果单因素方差用 SPSS 13.0 统计软件分析^[19],数据的多重性用 Duncan 法比较,图表均用 Excel 2007 制图。

2 结果与分析

2.1 RFP 荧光标记菌对 2 个苜蓿品种幼苗生物量的影响

生物量的大小通过其积累物质能力强弱充分反映,甘农 5 号苜蓿幼苗接种根瘤菌和接种红色荧光标记根瘤菌后苜蓿幼苗根鲜重及干重、地上部分鲜重及干重均高于未接种的处理。其中,接种 S. LH3436、S. 12531、S. LZgn5、S. LH3436-rfp3、S. 12531-rfp4 和 S. LZgn5-rfp2 的苜蓿幼苗根鲜重高出对照 15%~77%,根干重高出对照 92%~66%,地上鲜重高出对照 23%~58%,地上干重高出对照 18%~78%,均具有显著差异($P<0.05$),表明 S. LH3436、S. 12531、S. LZgn5 及其红色荧光标记根瘤菌具有一定的促生作用(表 1)。

接种 S. LH3436-rfp3、S. 12531-rfp4 和 S. LZgn5-rfp2 的甘农 5 号苜蓿幼苗根鲜重、根干重、地上鲜重和地上干重分别比接种对应根瘤菌 S. LH3436、S. 12531 和 S. LZgn5 高出 2.6%~12.4%,3.2%~13.5%、

1.4%~10.2%和1.8%~5.7%,差异均不显著($P<0.05$),表明接种红色荧光标记菌与接种对应根瘤菌相比无显著影响,而与未接种对照相比生物量的增加有明显促进效果,其中 S. 12531- rfp4 表现较好。

表 1 甘农 5 号苜蓿幼苗接种根瘤菌及红色荧光标记根瘤菌的生物量

Table1 Gannong no. 5 alfalfa seedlings after inoculation rhizobium and red fluorescently labeled rhizobium biomass				
编号	根鲜重/(g·株 ⁻¹)	根干重/(g·株 ⁻¹)	地上鲜重/(g·株 ⁻¹)	地上干重/(g·株 ⁻¹)
CK	0.02±0.65 ^b	0.002 5±0.02 ^b	0.26±0.58 ^b	0.055±0.05 ^b
S. LH3436	0.05±0.01 ^a	0.016 2±0.02 ^a	0.32±0.06 ^{ab}	0.104±0.09 ^{ab}
S. 12531	0.06±0.02 ^a	0.016 4±0.02 ^a	0.34±0.02 ^a	0.132±0.03 ^a
S. LZgn5	0.04±0.01 ^{ab}	0.016 3±0.03 ^a	0.33±0.04 ^a	0.122±0.03 ^a
S. LH3436-rfp3	0.05±0.03 ^a	0.017 1±0.01 ^a	0.31±0.11 ^{ab}	0.133±0.06 ^a
S. 12531-rfp4	0.04±0.03 ^{ab}	0.014 7±0.03 ^{ab}	0.33±0.06 ^a	0.147±0.13 ^a
S. LZgn5-rfp2	0.05±0.03 ^a	0.014 2±0.02 ^{ab}	0.35±0.03 ^a	0.120±0.02 ^{ab}

注:CK 表示未进行接种处理,同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$). 下同

苜蓿幼苗 WL343HQ 在接种红色荧光标记根瘤菌后生物量均明显提高。其中,苜蓿幼苗根鲜重及干重、地上鲜重及干重分别高出对照 33%~73%、92.5%~98.2%、40%~73.4%和 53.2%~90.1%,差异均显著($P<0.05$)。与接种对应根瘤菌相比,苜蓿幼苗接种 S. 12531-rfp4 后的根鲜重及干重、地上鲜重及干重分别增加了 0.42%、9.2%、2%和 12%,而接种 S. LH3436-rfp3 和 S. LZgn5-rfp2 后的苜蓿幼苗根干鲜重和地上干鲜重有甚微减少,但无显著差异,表明苜蓿幼苗 WL343HQ 接种红色荧光标记根瘤菌后,不同标记根瘤菌的表现均无显著差异,其中 S. LH3436-rfp3 表现较好(表 2)。

表 2 WL343HQ 苜蓿幼苗接种根瘤菌及红色荧光标记根瘤菌的生物量

Table 2 AlfalfaWL343HQ seedlings after inoculation rhizobium and red fluorescently labeled rhizobium biomass				
编号	根鲜重/(g·株 ⁻¹)	根干重/(g·株 ⁻¹)	地上鲜重/(g·株 ⁻¹)	地上干重/(g·株 ⁻¹)
CK	0.04±0.16 ^b	0.003 0±0.04 ^c	0.21±0.02 ^b	0.021±0.12 ^c
S. LH3436	0.12±0.06 ^a	0.108±0.04 ^a	0.35±0.09 ^{ab}	0.130±0.18 ^a
S. 12531	0.09±0.01 ^{ab}	0.040±0.02 ^b	0.44±0.03 ^a	0.182±0.12 ^a
S. LZgn5	0.15±0.03 ^a	0.164±0.06 ^a	0.46±0.12 ^a	0.173±0.08 ^{bc}
S. LH3436-rfp3	0.14±0.02 ^a	0.128±0.04 ^a	0.47±0.10 ^a	0.174±0.32 ^{ab}
S. 12531-rfp4	0.08±0.09 ^{ab}	0.040±0.02 ^b	0.43±0.05 ^a	0.175±0.02 ^a
S. LZgn5-rfp2	0.09±0.03 ^{ab}	0.064±0.06 ^b	0.49±0.05 ^a	0.119±0.20 ^{ab}

2.2 荧光标记菌及对应出发菌株对两品种苜蓿幼苗根长、株高等的影响

根长、株高、叶片数和叶面积直接影响着植株的生物量高低。甘农 5 号苜蓿幼苗接种红色荧光标记菌后,增加了苜蓿幼苗根长、株高、叶片数及叶面积的大小,并有显著差异($P<0.05$),其分别高出未接种对照的 24.9%~50.4%、30.3%~57.7%、26.5%~44.6%和 12%~14.5%。

甘农 5 号苜蓿幼苗接种 S. LH3436-rfp3, S. 12531-rfp4 和 S. LZgn5-rfp2 后相比接种对应出发菌,接种荧光红色荧光标记根瘤菌苜蓿幼苗的根长、株高、叶片数和叶面积分别高出 3%、7.2%、3.66%和 4.6%,无显著差异,但接种红色荧光标记苜蓿幼苗的根长高出未接种幼苗的 19.7%,差异显著($P<0.05$)。其中,S. 12531-rfp3 表现较好(表 3)。

苜蓿幼苗 WL343HQ 在接种红色荧光标记菌

后,幼苗根长、株高、叶片数和叶面积均有增加(表 4),分别高出未接种处理 9.2%~48.7%、43.3%~69.9%、18.2%~28.6%和 16.1%~24%,有显著差异($P<0.05$)。甘农 5 号苜蓿幼苗接种 S. LH3436-rfp3, S. 12531-rfp4 和 S. LZgn5-rfp2 后的幼苗根长、株高、叶片数和叶面积分别比接种对应根瘤菌的出发菌高出 13%、15.1%、11.1%和 2.1%,但接种红色荧光质粒的苜蓿幼苗根长高出对照的 12.5%,差异显著($P<0.05$)。其中,以 S. LH3436-rfp3 表现较好(表 4)。

2.3 荧光标记菌及其出发菌株对两品种苜蓿幼苗固氮能力的影响

测定苜蓿根瘤固氮酶活性的高低是确认有效根瘤菌的传统方法,直接反映苜蓿幼苗根瘤中根瘤菌固氮的能力强弱。甘农 5 号苜蓿幼苗接种红色荧光标记根瘤菌 S. LH3436-rfp3, S. 12531-rfp4 和 S. LZgn5-rfp2

和接种对应根瘤菌的苜蓿幼苗单株结瘤数、根瘤固氮酶活性和根瘤等级均与未接种对照差异显著 ($P<0.05$), 其中, 幼苗根瘤固氮酶活性是未接种处理的 9.1 ~ 12.2 倍, 表明接种红色荧光标记根瘤菌能增加根瘤的固氮酶活性, 并和接种对应根瘤菌无显著影响, 以 S. LZgn5-rfp2 表现较好 (表 5)。

表 3 甘农 5 号苜蓿幼苗接种红色荧光标记菌后的根长、株高、叶片数和叶面积

Table 3 Gannong no. 5 after seedling inoculation red fluorescent tags bacteria of root length, plant height, leaf number and leaf area

编号	根长/cm	株高/cm	叶片数	叶面积/cm ²
CK	6.37±0.32 ^b	5.73±1.99 ^c	10.33±2.40 ^c	0.32±0.02 ^c
S. LH3436	11.73±1.11 ^a	10.10±2.10 ^b	14.00±1.15 ^a	0.62±0.02 ^{ab}
S. 12531	10.33±0.17 ^{ab}	11.13±1.68 ^a	15.67±0.67 ^a	0.63±0.02 ^a
S. LZgn5	11.10±0.62 ^a	12.33±1.77 ^a	13.67±3.71 ^{ab}	0.66±0.04 ^a
S. LH3436-rfp3	12.27±0.15 ^a	11.43±4.96 ^a	15.67±2.91 ^a	0.65±0.12 ^a
S. 12531-rfp4	11.57±0.54 ^a	11.03±1.92 ^{ab}	14.00±3.06 ^a	0.67±0.03 ^a
S. LZgn5-rfp2	11.33±0.75 ^a	12.00±1.53 ^a	15.00±0.01 ^a	0.60±0.03 ^{ab}

表 4 WL343HQ 苜蓿幼苗接种红色荧光标记菌后的根长、株高、叶片数和叶面积

Table 4 AlfalfaWL343HQ seedlings after inoculation of red fluorescent tags bacteria of root length, plant height, leaf number and leaf area

编号	根长/cm	株高/cm	叶片数	叶面积/cm ²
CK	9.37±0.32 ^c	5.73±1.99 ^c	5.33±2.40 ^c	0.22±0.02 ^c
S. LH3436	15.73±1.11 ^a	10.10±2.10 ^b	14.00±1.15 ^a	0.62±0.02 ^a
S. 12531	14.33±0.17 ^{ab}	13.13±1.68 ^a	12.67±0.67 ^b	0.63±0.02 ^a
S. LZgn5	14.10±0.62 ^b	12.33±1.77 ^a	13.67±3.71 ^{ab}	0.56±0.04 ^b
S. LH3436-rfp3	15.27±0.15 ^a	12.43±4.96 ^a	14.67±2.91 ^a	0.65±0.12 ^a
S. 12531-rfp4	16.57±0.54 ^a	13.03±1.92 ^a	14.00±3.06 ^a	0.57±0.03 ^b
S. LZgn5-rfp2	15.33±0.75 ^a	14.00±1.53 ^a	15.00±0.01 ^a	0.60±0.03 ^a

表 5 甘农 5 号苜蓿幼苗接种红色荧光标记菌的的单株结瘤数、固氮酶活性、根瘤等级和标记菌占瘤率

Table 5 Gannong no. 5 per seedling inoculation red fluorescent tags bacteria nodule number and nitrogenase activity, and tags bacteria rate of tumor nodules level

编号	单株结瘤数	根瘤等级	根瘤固氮酶活性 /($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	占瘤率
CK	2.00±0.58 ^c	1.33±0.33 ^b	0.63±0.13 ^c	/
S. LH3436	15.00±2.08 ^a	4.67±0.33 ^a	11.53±0.12 ^a	/
S. 12531	9.00±1.73 ^b	4.33±0.33 ^{ab}	12.23±0.02 ^a	/
S. LZgn5	14.67±1.20 ^a	4.67±0.33 ^a	10.05±0.01 ^{ab}	/
S. LH3436-rfp3	15.67±7.17 ^a	4.98±0.33 ^a	14.45±0.11 ^a	54.8%±1.5% ^a
S. 12531-rfp4	12.00±1.73 ^{ab}	5.00±1.00 ^a	12.53±0.35 ^a	50.5%±1.4% ^{ab}
S. LZgn5-rfp2	13.33±1.45 ^{ab}	5.33±0.33 ^a	14.76±1.14 ^a	51.8%±1.2% ^b

注: 占瘤率参照文献[24]方法与 50% 进行比较, 即 50% 为对照, 对照的显著水平为 50%^a

苜蓿幼苗 WL343HQ 接种红色荧光标记根瘤菌和接种对应根瘤菌后, 幼苗 WL343HQ 相应的单株结瘤数、根瘤固氮酶活性和根瘤等级均与未接种处理差异显著 ($P<0.05$), 其中, 根瘤固氮酶活性是未接种的 5.1~12 倍, 试验表明苜蓿幼苗接种红色荧光标记根瘤菌能显著提高根瘤的固氮酶活性, 并与接种对应根瘤菌无显著差异。其中, 以 S. LH3436-rfp3 固氮酶活性最高的表现好。

2.4 荧光标记菌及其出发菌株对两品种苜蓿幼苗叶绿素的含量

叶绿素含量的高低反应了光合作用的强弱, 也体现了植株利用氮素能力的强弱, RFP 荧光标记菌分别接种的甘农 5 号紫花苜蓿的叶片叶绿素含量比对照高出 40.2%~51.2%, 差异显著 ($P<0.05$), 苜蓿幼苗接种红色荧光标记根瘤菌及接种对应根瘤菌的叶绿素含量显著高于未接种处理苜蓿 (图 1), 但接种荧光标记

表 6 WL343HQ 苜蓿幼苗接种红色荧光标记菌的的单株结瘤数、固氮酶活性、根瘤等级和标记菌占瘤率

Table 6 Alfalfa WL343HQ alfalfa seedlings inoculated red fluorescence labeling of individual nodule number and nitrogenase activity,and tags bacteria rate of tumor nodules level

编号	单株结瘤数	根瘤等级	根瘤固氮酶活性 /($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	占瘤率
CK	$2.00 \pm 0.58^{\text{b}}$	$1.33 \pm 0.33^{\text{b}}$	$0.54 \pm 0.12^{\text{c}}$	/
S, LH3436	$15.00 \pm 2.08^{\text{a}}$	$4.67 \pm 0.33^{\text{a}}$	$11.47 \pm 0.16^{\text{a}}$	/
S, 12531	$10.00 \pm 1.73^{\text{ab}}$	$4.33 \pm 0.33^{\text{a}}$	$12.34 \pm 0.02^{\text{a}}$	/
S, LZgn5	$11.67 \pm 1.20^{\text{a}}$	$4.67 \pm 0.33^{\text{a}}$	$10.34 \pm 0.04^{\text{ab}}$	/
S, LH3436-rfp3	$13.00 \pm 3.51^{\text{a}}$	$4.33 \pm 0.33^{\text{a}}$	$12.35 \pm 0.13^{\text{a}}$	$59.2\% \pm 1.5\%^{\text{a}}$
S, 12531-rfp4	$10.33 \pm 2.19^{\text{ab}}$	$4.00 \pm 0.58^{\text{ab}}$	$11.98 \pm 0.23^{\text{a}}$	$56.6\% \pm 1.2\%^{\text{a}}$
S, LZgn5-rfp2	$15.00 \pm 2.08^{\text{a}}$	$4.00 \pm 0.58^{\text{ab}}$	$10.43 \pm 1.65^{\text{ab}}$	$52.1\% \pm 1.2\%^{\text{b}}$

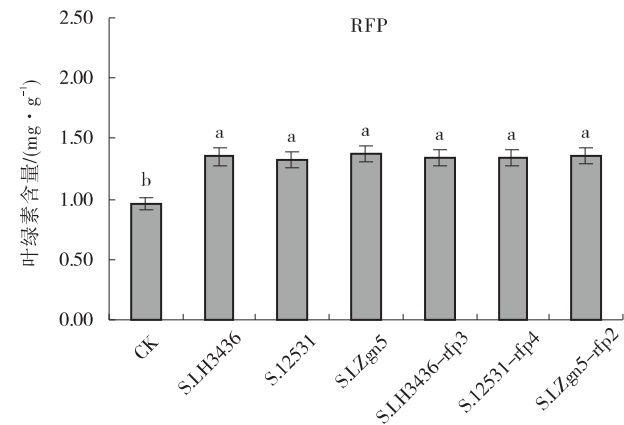


图 1 红色荧光标记菌接种甘农 5 号苜蓿幼苗后的叶片叶绿素含量

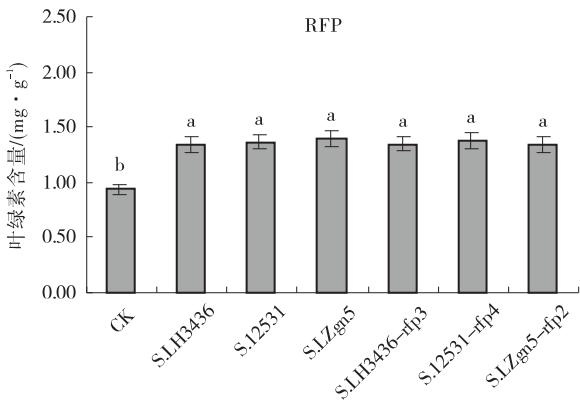


图 2 红色荧光标记菌接种 WL343HQ 苜蓿幼苗后的叶片叶绿素含量

Fig. 1 Red fluorescent tags bacteria after inoculation of gannongno. 5 after seedling leaf chlorophyll content
根瘤菌与接种对应根瘤菌的苜蓿幼苗之间叶绿素含量无显著差异。

RFP 荧光标记菌分别接种的紫花苜蓿 S. 12531 的叶片叶绿素含量比对照高出 38. 2%~47. 6%，差异显著($P<0.05$)。出发菌和荧光标记根瘤菌的叶绿素含量显著高于未接种苜蓿，而出发菌和荧光标记根瘤菌之间叶绿素含量无显著影响(图 2)。

3 讨论

3.1 两个苜蓿品种接种根瘤菌及红色荧光标记根瘤菌生物量及生长指标

苜蓿的生物量和生长指标是直观评价苜蓿品质的最重要因素,众多学者研究结果报道,豆科植物产量可通过接种根瘤菌来增加^[20]。目前,国内外都很重视根瘤菌的接种,多个国家在播种苜蓿前均先要进行根瘤

Fig. 2 Red fluorescent tags bacteria after inoculation of WL343HQ after seedling leaf chlorophyll content

菌接种处理,苜蓿在我国农业中有着不可替代的作用,从 1981 年开始一直筛选苜蓿根瘤菌优良菌株,本研究中,3 株根瘤菌与其红色荧光标记菌接种的苜蓿幼苗地上鲜重和干重、根鲜重和干重、根长、株高等均显著($P<0.05$)高于未接种苜蓿幼苗,这也符合多位研究学者的成果,得出苜蓿幼苗接种红色荧光标记菌和根瘤菌均对幼苗有明显的促生作用,且红色荧光标记根瘤菌对苜蓿幼苗根系无影响。

苜蓿根长、株高、叶片数和叶面积直接决定苜蓿的质量与产量,而荧光标记的转入不影响苜蓿的正常生长^[21],检测荧光标记菌的占瘤率均不能达到 100%,说明存在其他根瘤菌,可能是苜蓿种子里携带的根瘤菌,伴随种子萌发进入土壤根际,成为种子内生根瘤菌。荧光标记根瘤菌侵染苜蓿根系主要取决于根瘤菌细胞和质粒间的适当关系,两者对生存空间和养分供给的

不断竞争的能力决定了荧光标记根瘤菌能否在植物根系形成有效根瘤^[22-23]。红色荧光蛋白质粒根瘤菌的接种对 2 种苜蓿的生长均无减缓影响,反而增加了苜蓿各生长指标的标准,对苜蓿品种的差别未有特异性,并有一定的促生效果,这也符合陈力玉等^[8]的研究结果,荧光蛋白质粒标记根瘤菌不仅能直观的观测示踪,还可提升苜蓿品质,是一种研究固氮机理等很有效直接的方法,为后期深入研究奠定基础。

3.2 两个苜蓿品种接种根瘤菌及红色荧光标记根瘤菌固氮能力及叶绿素含量

固氮能力和植物叶绿素含量是对苜蓿的品质检测,测定固氮能力等指标对比接种根瘤菌,方可得知红色荧光蛋白质粒对苜蓿幼苗根瘤固氮能力有无影响,是否能继续运用其进行深入研究。试验中,设置表面灭菌且未接种红色荧光的种子盆栽自生根系结瘤为对照组,接种红色荧光蛋白的苜蓿盆栽根系结瘤为实验组,均能在回接红色荧光标记根瘤菌的苜蓿幼苗的根瘤中检测出红色荧光,筛选后的红色荧光标记根瘤菌相比标准无显著差异^[24],红色荧光质粒导入根瘤菌并接种不同品种苜蓿幼苗不影响根瘤菌的竞争结瘤能力,并无负面影响。罗明云等^[25]把 luxAB 基因导入花生根瘤菌中,检测遗传稳定性及回接测定,并得出经过实验结果分析 luxAB 基因不影响花生根瘤菌的正常生长及功能,试验测定不同品种苜蓿幼苗接种红色荧光标记根瘤菌固氮能力指标及叶绿素含量,可知红色荧光质粒的根瘤菌能成功侵染苜蓿根系并结瘤,能在苜蓿幼苗体内正常表达,并对标记菌的结瘤无影响。

根瘤菌固氮作用固定的氮素提供苜蓿幼苗生长的氮源,而结瘤固氮的前提是共生的有效性,苜蓿幼苗叶片叶绿素含量的多少能表征根瘤菌的共生有效性^[26]。S. LH3436, S. 12531 和 S. LZgn5 及其红色荧光标记根瘤菌接种的苜蓿叶片叶绿素含量与未接种处理相比有显著差异($P < 0.05$),且与其对应的根瘤菌叶绿素含量无显著差异,表明红色荧光标记根瘤菌接种不同品种苜蓿后共生有效性良好,并无品种特异性。

4 结论

通过接种红色荧光标记根瘤菌及其对应根瘤菌至甘农 5 号和 WL3436HQ 紫花苜蓿,研究其根瘤菌接种苜蓿幼苗的生物量及生长指标,结果表明接种红色荧光标记根瘤菌对苜蓿幼苗的各项指标无不利影响,

而表现出一定的促生效果,可促进苜蓿生物量的积累。研究 S. LH3436, S. 12531 和 S. LZgn5 及其对应红色荧光标记根瘤菌接种苜蓿幼苗与未接种苜蓿幼苗的固氮能力表现,结果表明接种根瘤菌与红色荧光标记根瘤菌均能明显提高苜蓿幼苗的固氮能力,和对对应根瘤菌之间无显著差异,以 S. LH3436-rfp2 和 S. LH3436-rfp1 较为突出。

参考文献:

- [1] Matz M V, Fradkov, Labas Y A, *et al.* Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(10): 969-973.
- [2] 王飞, 杨海涛, 王泽方. 红色荧光蛋白的研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(9): 32-47.
- [3] 杨晓玫. 红、黄、绿荧光蛋白标记根瘤菌的构建[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士论文, 2017.
- [4] 杨晓玫, 师尚礼. 红、黄、绿三种颜色荧光质粒导入大肠杆菌中的稳定性表达[J]. 甘肃农业大学学报, 2018, 53(3): 193-198.
- [5] 杨晓玫, 周彤, 阿芸, 等. 苜蓿根瘤菌 GFP 荧光标记株的构建及对结瘤固氮的影响[J]. 草原与草坪, 2018, 38(1): 44-56.
- [6] Tan G Y. Genetic variation for acetylene reduction rate and other character in alfalfa [J]. Crop Science, 1981, 21: 485-488.
- [7] 张虎天, 郭丽琢, 柴强, 等. 接种根瘤菌对豌豆/玉米体系根际细菌数量及氮营养的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2011, 46(1): 30-33.
- [8] 陈力玉, 张淑卿, 李剑锋, 等. 接种荧光标记根瘤菌对苜蓿幼苗生长的影响[J]. 草原与草坪, 2013, 33(6): 1-8.
- [9] 袁全, 杨梦华, 郑会明, 等. 中慢生型华癸根瘤菌 Mesorhizobium huakuii AS9 自体诱导物合成酶基因的筛选及其功能分析[J]. 土壤, 2009, 41(3): 459-463.
- [10] 殷爱华, 韩素芬. 豆科树种凝集素和根瘤菌胞外多糖结合反应与结瘤的关系[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2005, 29(5): 88-90.
- [11] Hoagland D, Arnon D I. The water culture method for growing plants without soil [J]. California Agricultural Experiment Station Bulletin, 1938(1): 1-39.
- [12] 高永革, 李黎, 刘祥等. 黄河滩区紫花苜蓿生产性能比较研究[J]. 草业科学, 2008, 25(7): 59-64.
- [13] Vertucci C W, Roosee, Crane J. The oretical basis of protocols foe seed storage optimummoisture contents for pea seeds stored at different temperature[J]. Annals of Botany, 1994, 74: 531-540.

- [14] 李剑峰,师尚礼,张淑卿. 环境酸度对紫花苜蓿早期生长和生理的影响[J]. 草业学报, 2010, 19(2): 47—54.
- [15] Hara S, Hashidoko Y, Desyatkin R V, *et al.* High rate of N₂ fixation by east Siberian cryophilic soil bacteria as determined by measuring acetylene reduction in nitrogen poor medium solid ified with gellan gum[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75: 2811—2819.
- [16] 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: 1885—1893.
- [17] 陈力玉. 基于三亲本杂交的荧光标记根瘤菌的构建及其稳定性检测研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士论文, 2013.
- [18] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [19] Muhammad Z, Asif T, Ata C Z, *et al.* Weed-crop competition effects on growth and yield of sugarcane planted using two methods[J]. Pakistan Journal of Botany, 2010, 42(2): 815—823.
- [20] 霍尔特(著). 刘复今(译). 伯杰鉴定手册[M](第八版). 济南: 山东大学出版社, 1988: 93—94.
- [21] 张淑卿. 根瘤菌在苜蓿植株体内的运移及影响因素[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- [22] 陈翠翠, 马元武, 冯永君, 等. MADS-box 家族蛋白在植物开花、结实及根瘤形成中的多功能调节作用[J]. 华北农学报, 2008, 23(S2): 80—83.
- [23] Dudeja SS. Persistence of *Bradyrhizobium* SP. (caianus) in a sandy loam[J]. Soil Biol Biochem, 1989, 21(5): 709—713.
- [24] 凌瑶, 张小平, 周俊初, 等. 用荧光酶基因 (cfp) 标记法研究菜豆根瘤菌的竞争性和有效性[J]. 中国土壤与肥料, 2008(1): 73—77.
- [25] 韩颖, 赵寿经, 杨瑜, 等. 玉米陈化关键酶基因 Zmlx-2 的 RNA 干扰载体的构建[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2016, 44(3): 136—140.
- [26] 董伟欣, 张月辰, 张迎迎. DsRED 红色荧光蛋白植物表达载体的构建和表达[J]. 河北农业大学学报, 2010, 5(3): 33.

Effect of the red fluorescent marked rhizobias on alfalfa seeding growth and nodulation ability

YANG Xiao-mei¹, SHI Shang-li¹, YAO Tuo^{1,2}, LV Dan-tong^{1,2}, LI Qi^{1,2},
LI Dong^{1,2}, YANG Rui-qi², XIE Hua-shan²

(College of Grassland Science, Gansu Agricultural University/Key Laboratory for Grassland Ecosystem of Ministry of Education/Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province/Sino U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Red fluorescent protein marked rhizobias (S. LZgn5-rfp3, S. LZgn5-rfp4, S. LZgn5-rfp2, S. 12531-rfp3, S. 12531-rfp4, S. 12531-rfp2, S. LH343-rfp3, S. LH343-rfp4, S. LH343-rfp2) that contained the plasmid with RFP (red fluorescent protein) gene were inoculated to Gannong No. 5 alfalfa and alfalfa WL343HQ. Biomass, nodule number, nitrogenase activity and the rate of effective nodules were measured. The results showed that the RFP fluorescence-marked rhizobias could promote plant growth and biomass accumulation of inoculated alfalfa. Compared with their corresponding original rhizobias, the RFP fluorescence-marked rhizobias did no injury the alfalfa seedling, could be expressed consistently in alfalfa plant, had no difference from the starting bacteria, had the similar growth promotion ability with original rhizobias. It could be stably expressed in alfalfa seedlings and had no difference from the starting bacteria. Considering ability, there is no specificity between the two alfalfa varieties.

Key words: rhizobia; alfalfa plant; red fluorescent protein; three-parent hybridization