

贮藏方法对紫花苜蓿种子内生根瘤菌传代能力的影响

刘畅¹, 师尚礼¹, 康文娟¹, 苗阳阳², 吴芳¹

(1. 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; 2. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院 草业科学系, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:为探索贮藏方法对紫花苜蓿种子内生根瘤菌传代能力的影响, 将青色荧光蛋白标记根瘤菌 gn5f(内源)和 12531f(外源)接种于结荚期甘农 5 号紫花苜蓿。收获的种子, 在 25 ℃+自然湿度(S1)、25 ℃+硅胶干燥(S2)、4 ℃+冰箱冷藏湿度(S3)和-4 ℃+冰箱冷冻湿度(S4)条件下贮藏 3 年, 然后播种于大田, 次代植株苗期进行内生根瘤菌传代能力和传代有效性检测, 以无菌水浇灌苜蓿植株后收获的种子为对照。结果表明: 标记根瘤菌 gn5f 和 12531f 均可通过种子传代到次代植株。S1 贮藏条件下, gn5f 在次代植株根、茎、叶的定殖数量显著高于其他处理($P < 0.05$), 次代植株苗期单株结瘤数、单株根瘤重、根瘤等级、固氮酶活性、单株叶片数、株高、根长、地上部分鲜重、地上部分干重、根鲜重、根干重较 CK 分别增加了 37.00%、1 183.54%、47.52%、23 909.07%、38.72%、40.63%、33.82%、68.11%、137.73%、223.70%、600.00%。S2 贮藏条件下, 12531f 在次代植株根部定殖数量最高, 为 560.63 cfu/g, 次代植株苗期单株结瘤数、根瘤直径、根瘤等级、固氮酶活性、单株叶片数、株高、根长、地上部分鲜重、地上部分干重、根鲜重、根干重较 CK 分别增加了 37.90%、21.33%、27.01%、288.21%、41.22%、39.40%、36.04%、72.37%、144.58%、284.05%、872.04%。适宜的贮藏方法有利于提高种子内生根瘤菌的传代能力和传代有效性, 但因根瘤菌株种类和来源而异。gn5f 内生种子在 S1 条件下贮藏、12531f 内生种子在 S2 条件下贮藏分别有助于 gn5f 和 12531f 传代到次代植株并高效结瘤固氮, 促进次代植株生长; 且 S2 条件贮藏的 12531f 内生种子形成的次代植株结瘤指标和生长指标显著优于 S1 条件贮藏的 gn5f 内生种子形成的次代植株。

关键词:紫花苜蓿; 种子; 贮藏方法; 内生根瘤菌; 传代能力

中图分类号:S541 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2022)02-0018-10

DOI: 10.13817/j.cnki.cyyep.2022.02.003



紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 是世界上种植面积最广的豆科牧草, 由于其适应性广、产草量高、且富含蛋白质、维生素和矿物质等营养, 被誉为“牧草之王”^[1]。它与根瘤菌共生形成根瘤, 能固定大气中的

氮, 进而提高产量。紫花苜蓿与根瘤菌的结合方式既有外部侵染方式, 也有内生方式, 既有共生促生方式, 也有联合促生方式, 二者的结合方式与促生效应或共生效应关系密切, 这是紫花苜蓿与根瘤菌共生育种的研究热点。苜蓿根瘤菌以内生菌形式存在时, 可以合成化合物促进植物生长、提高植物对水分和营养的吸收、联合固氮、提高植物的抗逆性^[2]。根瘤菌内生于紫花苜蓿种子, 可运移并定殖于苜蓿根、茎、叶、种子等组织^[3], 通过种子内生根瘤菌传代结瘤和固氮促生, 这是共生系统可持续性的表现形式。苗阳阳^[4]对苜蓿添加

收稿日期:2021-03-09; **修回日期:**2021-03-29

基金项目:国家牧草产业技术体系项目(CARS-34)

作者简介:刘畅(1996-), 女, 辽宁盘锦人, 在读硕士。

E-mail: 1309680785@qq.com

师尚礼为通信作者。

E-mail: Shishl@gsau.edu.cn

适宜浓度的外源物质如硼、赤霉素、苦参碱并接种荧光标记根瘤菌株,可以促使根瘤菌侵染苜蓿根系进入其内部,在苜蓿植株体内运移并定殖,最后运移到成熟种子中。种子内生菌可以协助寄主植物抗菌^[5],提高植物抗旱能力^[6]。种子内生根瘤菌能否传代至次代植株并结瘤固氮,对于种子内生根瘤菌的有效利用和在植物代际间的功能延续具有重要意义。

研究表明植物内生微生物也可垂直传代^[7],Adam 等^[8]研究发现南瓜(*Cucurbita moschata*)种子内生微生物可以垂直传播到下一代植物。Liu 等^[10]报道了在水稻(*Oryza sativa*)和玉米(*Zea mays*)中特定的内生菌可以进行多代传代,Johnston-Monje 等^[11]使用绿色荧光蛋白对内生菌进行标记,证明了内生菌是从玉米种子进入根和根际土壤,再运移到植物的其他组织,赵霞^[12]对水稻种子内生细菌来源测定发现水稻植株内生菌存在代际间传代。

紫花苜蓿的主要繁殖方式为种子繁殖,种子质量直接影响到牧草产量^[13],温度、湿度是影响种子质量的关键因素,也影响着种子内生菌的数量及生命力^[14]。李春杰等^[15]研究发现,随着贮藏温度的升高,苜蓿种子携带真菌检出率逐渐增高,张远兵等^[16]发现冰箱内湿藏后的牡丹(*Paeonia suffruticosa*)种子萌发率最高,孔祥辉等^[17]发现韭菜(*Allium tuberosum*)种子经过硅胶干燥处理后可以延长贮藏寿命。苜蓿种子内生根瘤菌在不同温度及水分条件下,是否可以保存活性并传代,目前鲜见报道。因此,本研究以不同贮藏方式的内生青色荧光蛋白(GFP)标记根瘤菌的紫花苜蓿种子为试验材料,通过对内生根瘤菌种子次代植株体内 GFP 根瘤菌分布和定殖数量研究,明确苜蓿种子内生根瘤菌传代能力和结瘤有效性,并筛选出有利于提高种子内生根瘤菌传代能力和传代有效性的最佳贮藏方法,为揭示优良根瘤菌在苜蓿种子代际间的延续提供依据,也为紫花苜蓿—根瘤菌共生育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

种子来源:苗阳阳^[4]于 2014 年在草业生态系统教育部重点实验室牧草实训基地生长 4 a 的甘农 5 号紫花苜蓿(*Medicago sativa* cv. Gannong No. 5),通过结

荚期以根部直接浇灌的接种方法接种青色荧光蛋白(GFP)标记的根瘤菌株 *Ensifer meliloti* LZgn5f(gn5f)和根瘤菌株 *Ensifer meliloti*12531f(12531f)获得两种内生根瘤菌种子,室内风干两个月后进行贮藏^[18]。以无菌水浇灌苜蓿植株后收获的种子为对照。

gn5f 的原始菌株 *E. meliloti* LZgn5 分离自甘农 5 号紫花苜蓿种子的内源根瘤菌,为快生型产酸根瘤菌;12531f 原始菌株 *E. meliloti*12531 购自中国科学院微生物保藏中心—分离自非本苜蓿植株体内的外源根瘤菌,为慢生型产碱中华根瘤菌,通过三亲本杂交法构建荧光标记根瘤菌。

培养基:YMA 刚果红培养基(1 L):0.5 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$,0.2 g $MaSO_4 \cdot 7H_2O$,0.1 g NaCl,10 g 甘露醇,1 g 酵母粉,10 mL 0.25 g/100 mL 刚果红溶液,1 000 mL 蒸馏水,pH 值 7.0,固体培养基加琼脂 15 g/L。

营养液:Hoagland 有氮营养液和 Hoagland 无氮营养液,以 1 mol/L 的 NaOH 溶液或 1 mol/L HCl 溶液调节营养液 pH 值=7.0±0.1。

1.2 试验方法

1.2.1 种子贮藏 将分别含 gn5f 和 12531f 的甘农 5 号紫花苜蓿种子和对照种子于 2014 年 11 月—2017 年 11 月进行预处理,具体方法为:采用信封包装,25 ℃+自然湿度(相对湿度为 45%—65%)(S1)、25 ℃+硅胶干燥(每一个月更换一次硅胶)(S2)、4 ℃+冰箱冷藏湿度(S3)和-4 ℃+冰箱冷冻湿度(S4)下贮藏^[18]。

1.2.2 苜蓿幼苗培养 在草业生态系统教育部重点实验室沙培法栽培苜蓿幼苗^[19]。严格控制生长条件与试验条件,区组内差异视为试验误差。分别选取贮藏后健康饱满、大小一致的紫花苜蓿 gn5f 内生种子、12531f 内生种子和对照种子,在无菌操作台内碘伏消毒 2 min 并用无菌水清洗 4 次后用无菌滤纸吸干水分。蛭石、细沙洗净烘干,灭菌(121 ℃,灭菌 26 min)3 次后,蛭石:细沙=1:1 装入直径 30 cm、高 30 cm、容积 21 L 的花盆内,花盆栽入土中 20 cm 深。每盆播种 50 粒已消毒的种子,表面覆盖干沙 2 cm 左右。每花盆内加 Hoagland 有氮营养液 1 次,发芽前浇无菌水补充水分。发芽后每 15 天浇 Hoagland 无氮营养液 1 次,期间浇无菌水补充水分,45 d 收获苜蓿植株(植株相对高度约 18 cm)。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 苜蓿植株体内荧光标记根瘤菌的检测 每处理每个重复随机取 3 株幼苗,根、茎、叶分离,分别称取 1 g 置于无菌三角瓶中,在超净工作台内用医用碘伏浸没各部分震荡消毒 2 min 后,用无菌水冲洗,直至冲洗液澄清透明无泡沫。将表面消毒的植物组织在固体培养基上放置 30 min 后取出,培养基置于 28 ℃ 下培养 48 h,未长出菌落表明植物组织表面已彻底消毒^[20],将消毒后的各个组织放到无菌研钵中,加无菌水 2 mL,充分研磨后,将研磨液倒入 5 mL 无菌离心管中,4 000 r/min,离心 5 min,吸取 0.2 mL 上清液涂布于含刚果红的 YMA 固体培养基中(根部吸取上清液后,用无菌水配置成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释液),28 ℃ 培养 48 h^[21]。培养结束后,黑暗条件下用手提式紫外灯(波长 336 nm)观察并记录发青色的荧光标记根瘤菌落数,换算出每克植物组织中荧光标记根瘤菌数量^[22]。

1.3.2 结瘤能力检测 每处理每个重复随机取 10 株幼苗(根系完整),蒸馏水冲洗根系周围细沙、蛭石,无菌滤纸吸干水分。

(1)测定苜蓿幼苗的单株结瘤数;(2)测定苜蓿幼苗的单株有效根瘤重,使用灭菌的手术刀,将每株幼苗的所有根瘤沿根瘤与根系连接处切下,放在滤纸上吸干表面水分后称重^[23];(3)苜蓿幼苗的根瘤直径测量:游标卡尺;(4)根瘤等级:根瘤等级划分参考 5 分制计分法^[24]:1 分:中空无内容物的死亡根瘤;2 分:横切面呈灰白色的无效根瘤;3 分:直径小于 0.5 mm 的粉色根瘤;4 分:直径 0.5~1 mm 的粉色根瘤;5 分:直径大于 1 mm 的粉色根瘤;(5)固氮酶活性:采用乙炔还原法^[25]。切下根瘤,称取鲜重,放置 8 mL 青霉素瓶中,盖紧瓶塞并密封,使用微量注射器抽取 0.8 mL 空气,并注入 0.8 mL 乙炔气体,反应 2 h。然后使用 100 μ L 微量注射器吸取 50 μ L 瓶内气体注入气象色谱仪^[26]。

C_2H_4 水平(μ mol/(g·h))=

$$\frac{C \times hx \times V}{hs \times 1\,000 \times 22.4 \times t \times m} \quad [26]$$

C:标准 C_2H_4 浓度(nmol/mL);hx:样品峰面积;V:反应气体体积(mL);hs:标准 C_2H_4 峰面积 22.4(乙炔的物质的量);t:反应时间(h);m:瘤重(g)。

1.3.3 生长指标 每处理每个重复随机取 4 株幼苗(根系完整),蒸馏水冲洗根系周围细沙、蛭石,无菌滤

纸吸干水分,测定生长指标。

(1)单株叶片数(复叶);(2)株高、根长测量:直尺;(3)地上生物量:天平称取地上鲜重;然后放于烘箱中 105 ℃ 烘 20 min,随后 80 ℃ 烘至恒重,称其干重;(4)地下生物量:同(3)。

1.4 数据处理

数据结果采用 SPSS 20.0 进行方差分析,Duncan 法多重比较,利用 R 语言做相关性分析,EXCEL 2016 制图。

2 结果与分析

2.1 贮藏方法对苜蓿种子内生根瘤菌传代定殖的影响

不同贮藏处理下,次代植株各组织部位中可不同程度检测到 gn5f、12531f 根瘤菌。苜蓿种子内生根瘤菌可传代至次代植株中(图 1)。

gn5f 在 S1、S3、S4 贮藏处理的植株根部可检测到,且 S1 贮藏处理较 S3、S4 贮藏处理根瘤菌数量分别增加了 308.88% 和 78.07% ($P < 0.05$),而 S2 贮藏处理未检测到(图 1-A)。12531f 在 S1、S2、S4 贮藏处理的植株根部可检测到,且 S2 处理根部定殖数量最大,为 560.63 cfu/g,显著高于 S1 和 S4 ($P < 0.05$),分别提高了 117.23%、284.60%;S3 贮藏处理根部未检测到 12531f。CK 处理根部均未检测到 gn5f 和 12531f (图 1-A)。

次代植株茎部标记根瘤菌定殖情况为,gn5f 在 S1、S3、S4 贮藏处理植株茎部可检测到,S1 贮藏处理茎部定殖数量最多,为 303.03 cfu/g,分别高于 S3、S4 贮藏处理 117.11% 和 36.00% ($P < 0.05$)。12531f 在 S1、S4 贮藏处理植株茎部检测到,S1 贮藏处理的定殖数量最大,为 36.13 cfu/g,高于 S4 294.33% ($P < 0.05$)。标记根瘤菌 gn5f、12531f 在 CK 和 S2 贮藏处理植株茎部未检测到(图 1-B)。

次代植株叶部标记根瘤菌定殖情况为 gn5f 在 S1、S2 贮藏处理植株叶部可检测到,S1 贮藏处理叶部定殖数量最大,为 11.10 cfu/g,显著高于 S2 贮藏处理 127.46% ($P < 0.05$)。12531f 在 S2、S3、S4 贮藏处理植株叶部可检测到,S4 贮藏处理 12531f 定殖数量最多,为 25.27 cfu/g,较 S2、S3 贮藏处理分析增加了 17.97% 和 410.50% ($P < 0.05$),但 S1 贮藏处理未检测到。gn5f、12531f 在 CK 叶部均未检测到(图 1-C)。

根据以上分析,gn5f 在 S1 处理各部位数量均最高,12531f 在 S2 处理根部数量最高,两个菌株在次代植株中的内生部位和定殖数量受到种子贮藏条件的影

响。在各贮藏处理下,次代植株两个菌株内生部位从根、茎到叶,根瘤菌数量均呈递减趋势,且根部>>茎部>>叶部。

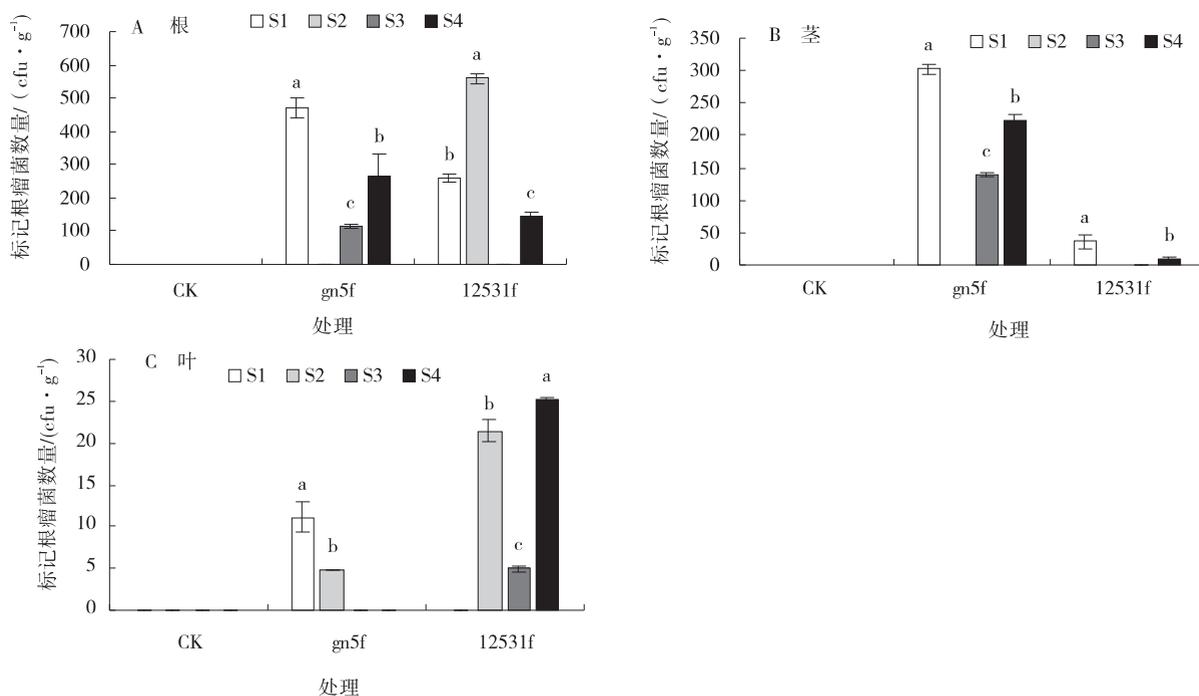


图 1 不同贮藏方法下苜蓿内生荧光标记菌株 gn5f、12531f 在次代植株根、茎、叶内的定殖数量

Fig. 1 Colonization number of alfalfa endophytic fluorescent protein-labeled strains gn5f and 12531f in the roots, stems and leaves of the next generation plants under different storage methods

注:图内数据为平均值±标准误,不同小写字母表示同一菌株不同贮藏条件下差异显著($P < 0.05$)

2.2 贮藏方法对次代植株结瘤有效性的影响

各贮藏处理下,不同程度增加 gn5f、12531f 在次代植株上的结瘤能力(图 2)。S1 贮藏处理次代 gn5f 单株结瘤数最高,为 12.33 个,较 CK 高 37%。S3 贮藏处理单株结瘤数为 8.67 个,较 CK 高 8.38%。S2、S4 贮藏处理单株结瘤数分别为 6.33 个和 6 个,较 CK 分别减少了 34.52%、27.97% ($P < 0.05$)。S2 处理 12531f 单株结瘤数最高,为 13.33 个,较 CK 高 37.90% ($P < 0.05$)。S1、S4 贮藏处理单株结瘤数分别为 7 个和 5 个,较 CK 分别减少了 22.22%、39.98%；S3 贮藏处理单株结瘤数为 10.67 个,高于 CK 33.38% ($P < 0.05$) (图 2-A)。

S1 贮藏处理 gn5f 单株有效根瘤重最高,为 0.1014 g,较 CK 增加了 1183.54% ($P < 0.05$)。S2 贮藏处理单株有效根瘤重为 0.0169 g,较 CK 减少了 3.98%。S3、S4 贮藏处理单株有效根瘤重分别为 0.0376 g 和 0.0145 g,较 CK 分别增加了 353.01%、62.92% ($P < 0.05$)。S3 贮藏处理 12531f 单株有效根瘤重最大,为 0.028 g,较 CK 增加了 237.35% ($P < 0.05$)。

S1、S2 贮藏处理单株有效根瘤重分别为 0.0145 g 和 0.0220 g,分别高于 CK 83.54%、25% (图 2-B)。

4 个贮藏处理下,gn5f、12531f 根瘤直径均高于 CK。gn5f、12531f 均在 S2 贮藏处理根瘤直径最高,分别为 2.16 mm 和 1.82 mm,较 CK 分别增加了 44.00% 和 21.33% ($P < 0.05$) (图 2-C)。

S1 贮藏处理 gn5f 根瘤等级最高,为 5,显著高于 CK 和同菌株其他贮藏处理 ($P < 0.05$)。S2 贮藏处理根瘤等级为 3,较 CK 减少了 25.00%。S2 贮藏处理 12531f 根瘤等级最大,为 5,较 CK 增加了 25.00% ($P < 0.05$)；S1 贮藏处理根瘤等级为 4,高于 CK 33.33%；S4 贮藏处理根瘤等级为 2,较 CK 减少了 33.33% ($P < 0.005$) (图 2-D)。

S1 贮藏处理 gn5f 固氮酶活性最强,为 60.46 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$,显著高于 CK ($P < 0.05$)。S3、S4 处理固氮酶活性有不同程度提升,且 S2 贮藏处理 12531f 固氮酶活性最强,为 126.44 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 。S1、S4 贮藏处理固氮酶活性为 0.0343 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 、0.1621 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$,较 CK 分别减少了 86.38%、44.68%；

S3 贮藏处理固氮酶活性为 $81.67 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ ($P < 0.05$) (图 2-E)。

2.3 不同贮藏方法种子内生根瘤菌对次代植株生长的促进效应

S1、S3 贮藏处理次代植株 gn5f 单株叶片数分别为 14.33 和 11.00, 分别高于 CK 38.72%、17.90% ($P < 0.05$)。S2、S4 贮藏处理单株叶片数和 CK 一样, 分别为 11.33 和 9.67。S2、S3 贮藏处理 12531f 单株叶片数分别为 16.00 和 11.67, 分别高于 CK 41.22%、25.08% ($P < 0.05$)。S1、S4 贮藏处理单株叶片数为 11.33 和 11, 分别高于 CK 9.67%、13.75% (图 3-A)。

4 个贮藏处理下, 次代植株的株高均高于 CK。gn5f 在 S1 贮藏处理株高最大, 为 19.52 cm, 较 CK 增

加了 40.63% ($P < 0.05$)。12531f 在 S2 贮藏处理株高最大, 为 19.85 cm, 较 CK 增加 39.40% ($P < 0.05$) (图 3-B)。

4 个贮藏处理下, 次代植株根长均高于 CK。gn5f 在 S1 贮藏处理根长最高, 为 15.43 cm ($P < 0.05$), 较 CK 增加了 33.82% ($P < 0.05$)。12531f 在 S2 贮藏处理根长最大, 为 17.23 cm, 较 CK 增加 36.04% ($P < 0.05$) (图 3-C)。

内生根瘤菌对次代植株苗期的生物量积累有不同程度的促进作用, S1 贮藏处理次代植株 gn5f 地上鲜重最高, 为 0.4934 g, 较 CK 高 68.11% ($P < 0.05$)。S2 贮藏处理地上鲜重为 0.2871 g, 较 CK 减少了 3.63%; S3、S4 贮藏处理地上鲜重分别为 0.3612 g、

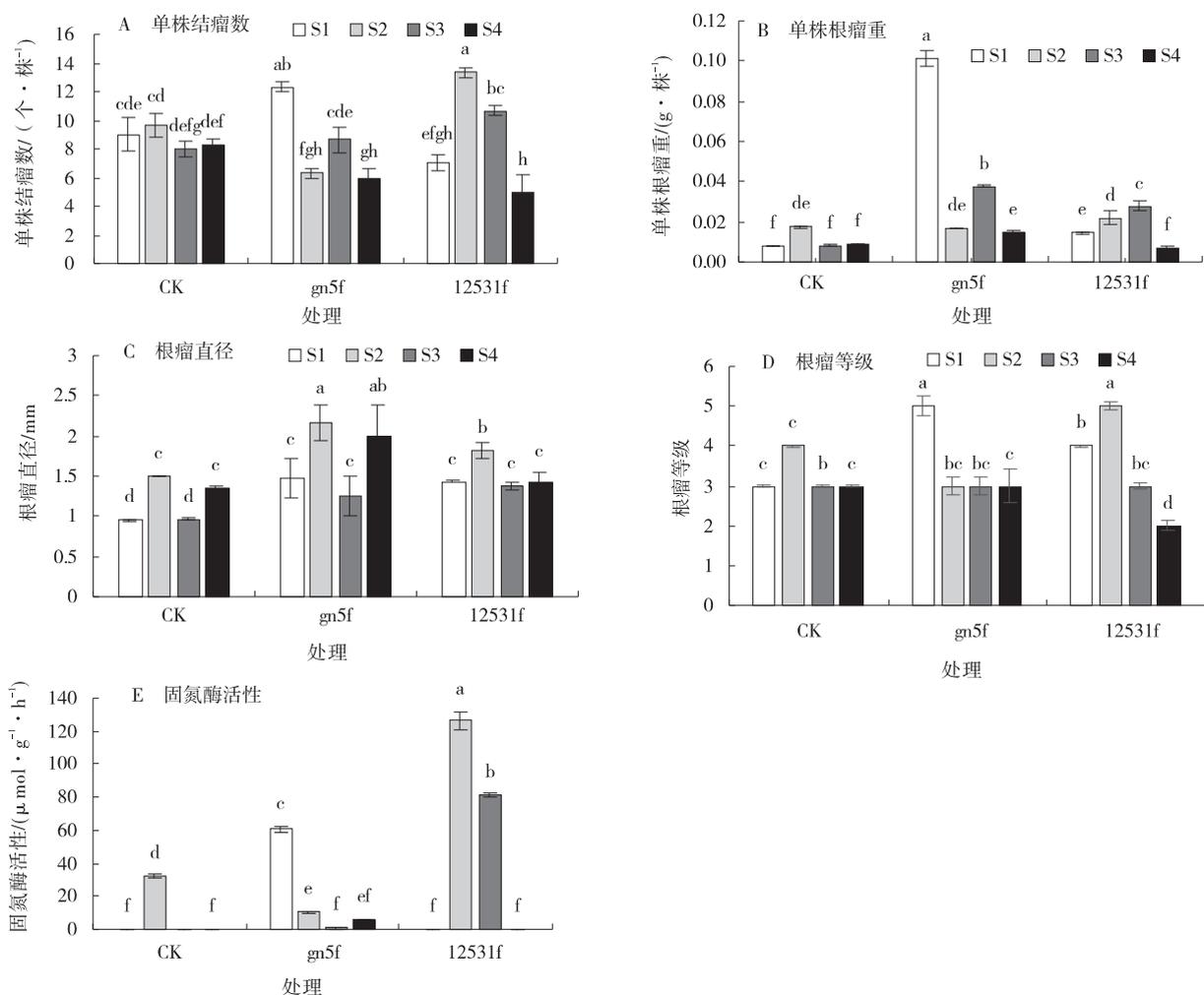


图 2 不同贮藏方法下内生 gn5f、12531f 种子的次代苜蓿幼苗单株结瘤数、单株根瘤重、根瘤直径、根瘤等级、固氮酶活性

Fig. 2 Nodule number, Nodule weight, Nodule diameter, Nodule grade, Nitrogenase activity of alfalfa seedlings formed from gn5f-and 12531f-colonized-seeds stored under different methods

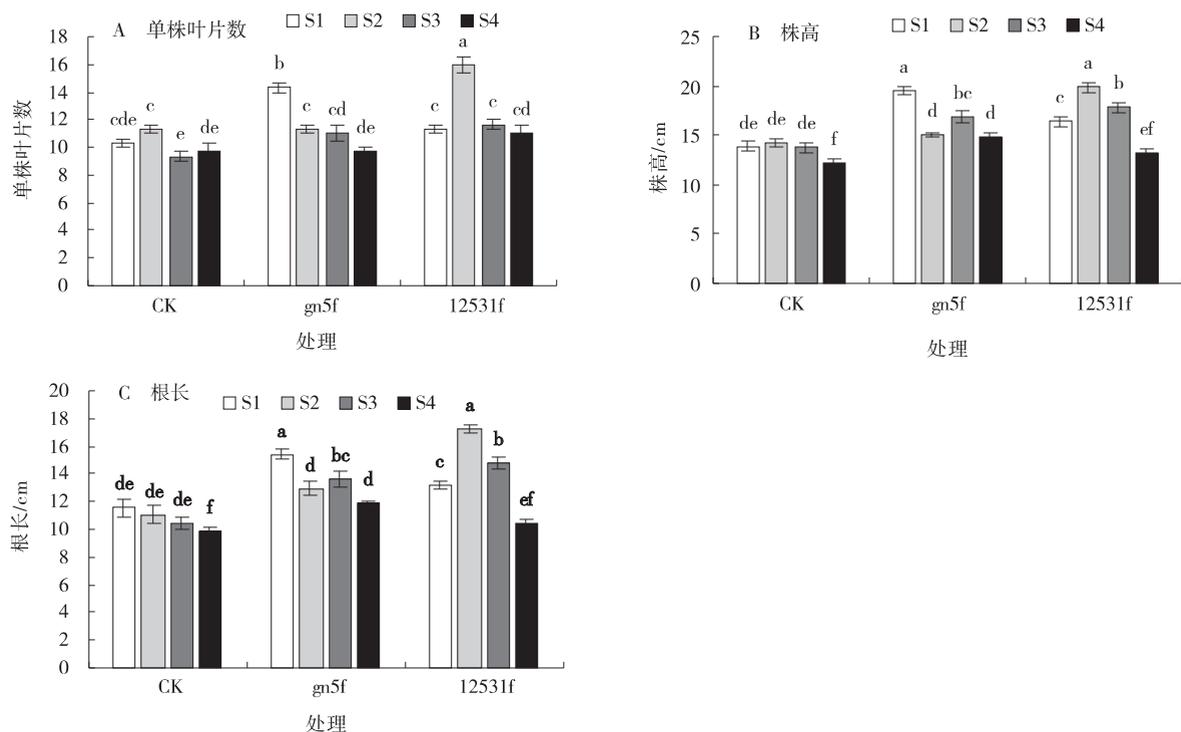


图 3 在不同贮藏方法下内生 gn5f、12531f 种子的次代苜蓿幼苗单株叶片数、株高、根长

Fig. 3 Leaf number per plant, plant height and root length of alfalfa seedlings formed from gn5f-and 12531f-colonized seeds stored under different methods

0.2837g, 较 CK 分别高 39.89%、9.71%。4 种贮藏处理下 12531f 地上鲜重均高于 CK, 在 S2 贮藏处理地上鲜重最高, 为 0.5135 g, 较 CK 提高了 72.37% ($P < 0.05$) (表 1)。

4 个贮藏处理下, 次代植株地上干重均高于 CK。gn5f 在 S1 贮藏处理地上干重最高, 为 0.1405 g, 较 CK 增加了 137.73% ($P < 0.05$)。12531f 在 S2 贮藏

处理下地上干重最高, 为 0.1399 g, 较 CK 增加了 144.58% ($P < 0.05$)。

4 个贮藏处理下, 次代植株根鲜重均高于 CK。gn5f 在 S1 贮藏处理根鲜重最高, 为 0.4179 g, 较 CK 增加了 223.70% ($P < 0.05$)。12531f 在 S2 贮藏处理根鲜重最高, 为 0.3587 g, 较 CK 增加了 284.05% ($P < 0.05$)。

表 1 不同贮藏方法下次代植株苗期的生物量

Table 1 Seedling biomass of next generation plants under different storage methods

菌株		地上鲜重/ (g · 株 ⁻¹)	地上干重/ (g · 株 ⁻¹)	根鲜重/ (g · 株 ⁻¹)	根干重/ (g · 株 ⁻¹)
CK	S1	0.293 5 ± 0.006 4 ^d	0.059 1 ± 0.00 4 1 ^{cd}	0.129 1 ± 0.024 9 ^c	0.014 8 ± 0.003 6 ^b
	S2	0.297 9 ± 0.006 1 ^d	0.057 2 ± 0.007 2 ^{cd}	0.093 4 ± 0.014 6 ^c	0.019 3 ± 0.001 4 ^b
	S3	0.258 2 ± 0.005 8 ^c	0.040 7 ± 0.000 9 ^d	0.112 4 ± 0.022 5 ^c	0.01 ± 0.002 ^b
	S4	0.258 6 ± 0.004 ^e	0.040 3 ± 0.000 4 ^d	0.084 7 ± 0.001 7 ^c	0.007 4 ± 0.000 1 ^b
gn5f	S1	0.493 4 ± 0.006 4 ^a	0.140 5 ± 0.006 ^a	0.417 9 ± 0.130 6 ^a	0.103 6 ± 0.041 1 ^a
	S2	0.287 1 ± 0.003 2 ^{de}	0.069 3 ± 0.001 8 ^{bc}	0.145 8 ± 0.039 2 ^c	0.027 6 ± 0.01 ^b
	S3	0.361 2 ± 0.003 7 ^c	0.0731 ± 0.004 4 ^{bc}	0.188 7 ± 0.024 6 ^{bc}	0.032 1 ± 0.014 3 ^b
	S4	0.283 7 ± 0.033 8 ^{de}	0.058 4 ± 0.006 ^{cd}	0.146 6 ± 0.018 9 ^c	0.019 4 ± 0.004 7 ^b
12531f	S1	0.416 9 ± 0.002 4 ^b	0.073 7 ± 0.004 6 ^{bc}	0.198 3 ± 0.048 2 ^{bc}	0.036 1 ± 0.007 9 ^b
	S2	0.513 5 ± 0.003 8 ^a	0.139 9 ± 0.012 7 ^a	0.358 7 ± 0.094 5 ^{ab}	0.090 4 ± 0.026 5 ^a
	S3	0.338 7 ± 0.005 7 ^c	0.069 7 ± 0.007 5 ^{bc}	0.141 ± 0.037 5 ^c	0.018 4 ± 0.006 1 ^b
	S4	0.371 4 ± 0.002 ^c	0.079 6 ± 0.005 ^b	0.250 4 ± 0.065 7 ^{abc}	0.042 6 ± 0.004 8 ^b

注: 图内数据为平均值 ± 标准误, 不同小写字母表示同一贮藏条件下不同菌株的差异性显著 ($P < 0.05$)

4种贮藏处理下 gn5f 根干重均高于 CK, 在 S1 贮藏处理根干重最高, 为 0.1036 g, 较 CK 增加了 600.00% ($P < 0.05$)。S2、S3、S4 贮藏处理根干重分别为 0.0276 g、0.0321 g、0.0194 g, 较 CK 分别增加了 196.77%、221.00%、162.16%。12531f 在 S2 贮藏处理根干重最高, 为 0.0904 g, 较 CK 增加了 872.04% ($P < 0.05$)。

2.4 次代植株传代根瘤菌结瘤有效性与生长效应的相关性分析

对不同贮藏处理下的次代植株根系结瘤有效性、生长效应进行相关性分析表明, 单株结瘤数与根瘤等级、固氮酶活性、单株叶片数、株高、根长均呈极显著正相关 ($P < 0.01$), 相关系数达到 70% 以上, 与地上鲜重、地上干重呈正相关 ($P < 0.05$); 根瘤等级和固氮酶活性都与单株叶片数、株高、根长、地上干重呈极显著正相关 ($P < 0.01$) (图 4)。单株叶片数和根长与单株有效根瘤重、根瘤直径不相关外, 与其他 9 个指标间亦呈极显著正相关 ($P < 0.01$), 相关系数达到 75% 以上。株高与根瘤直径不相关外, 与单株有效根瘤重呈正相关 ($P < 0.05$), 与其他 9 个指标间亦呈极显著正相关

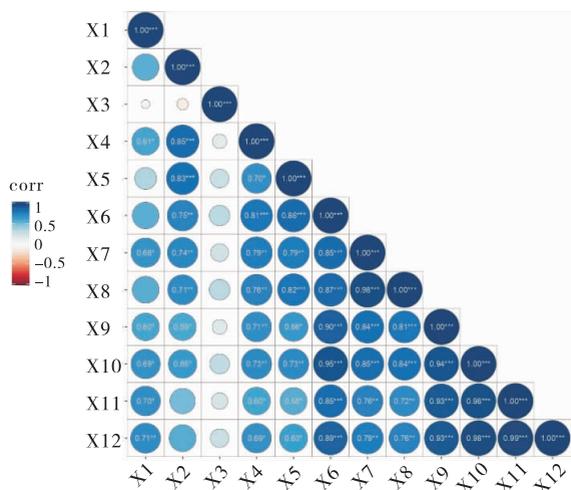


图 4 贮藏方法对次代植株苗期根系结瘤能力、幼苗生长能力的相关性分析

Fig. 4 Correlation analysis of storage methods on root nodulation ability and seedling growth of next generation plants

注: * 表示显著相关 ($P < 0.05$); ** 表示极显著相关 ($P < 0.01$); X₁: 单株有效根瘤重; X₂: 单株结瘤数; X₃: 根瘤直径; X₄: 根瘤等级; X₅: 固氮酶活性; X₆: 单株叶片数; X₇: 株高; X₈: 根长; X₉: 地上鲜重; X₁₀: 地上干重; X₁₁: 根鲜重; X₁₂: 根干重

($P < 0.01$); 地上鲜重与单株叶片数、株高、根长、地上干重、根鲜重、根干重呈极显著正相关 ($P < 0.01$), 相关系数达到 80% 以上 (图 4)。根瘤直径与其他 11 个指标之间的相关性较低。

3 讨论

内生根瘤菌是能与宿主植物互利共生的有益细菌, 可以合成化合物促进植物生长、提高植物对水分和营养的吸收、联合固氮、提高植物的抗逆性^[27]。种子是下一代植株内生根瘤菌的重要来源, 但是种子内生根瘤菌的来源并不明确。而在本研究中, 将具有荧光标记根瘤菌的种子作为试验材料, 有利于更深入地研究内生根瘤菌的传代能力和传代有效性, 同时避免了其他来源内生根瘤菌的干扰。此外, 本研究采用不同贮藏方法的内生根瘤菌种子, 可筛选出适宜优良苜蓿-根瘤菌共生体的贮藏条件。

本研究在次代植株苗期的各部位均可检测到 gn5f、12531f, 说明种子内生根瘤菌可以传代至次代植株中。张彩文^[28]在研究中发现, 水稻亲代种子内生菌可在植株生长发育过程中传播到根、茎组织并最终传播到子代种子内, 即种子内生菌可以进行垂直传播, 与本试验结果一致。张淑卿^[29]标记菌迁移试验发现的根瘤菌自根向茎顶部的运移通道是存在的, 标记根瘤菌在运移通道中的分布是不连续的, 在部分通道组织内只能选择性允许标记菌通过, 不能长期定殖。本试验中不同贮藏条件的种子内生根瘤菌虽均可以传代至次代植株中, 但两种菌株在根部定殖数量高于茎、叶部, 且 gn5f 在 S1 贮藏处理根、茎、叶部定殖数量显著高于其他贮藏处理; 12531f 在 S2 贮藏处理根部定殖数量显著高于其他贮藏处理, 个别贮藏条件下的次代植株苗期根、茎、叶部未检测到标记根瘤菌, 可能是茎、叶部位标记根瘤菌测定不表现, 这都证实了其研究结果。

gn5f 和 12531f 在次代植株苗期的定殖数量有差异, gn5f 在 S1 贮藏条件次代植株中的数量最多, 12531f 在 S2 贮藏条件次代植株中的数量最多。可能是由于两种菌株来源不同, 对于甘农 5 号紫花苜蓿来说, gn5f 原始菌株 gn5 为内源菌株, 是快生型根瘤菌, 12531f 原始菌株 12531 为外源菌株, 是慢生型根瘤菌, 两种菌株的遗传性状差异较大; 其次可能是种子贮藏方法不同导致内生根瘤菌在次代植株传代能力不同。

温度影响细菌的生理生化代谢途径, Hoch 等^[30]研究发现当温度低于 12 ℃ 时, 微生物的生长速率与温度成正相关, 在适宜温度下, 细菌繁殖快, 更容易存活, 温度过低后微生物生长出现逆境, 表现为微生物数量较低等, 祁娟^[31]的研究表明在 -16~20 ℃ 苜蓿种子内生菌根瘤菌存在着低温临界点, 低于此温度临界点, 苜蓿种子内生菌根瘤菌生长会受阻, 本试验也证实了这一点。适宜的贮藏温度内生菌根瘤菌适合存活可以顺利传代, 而低温对微生物生长的抑制作用较大, 从而导致 -5 ℃ 下内生菌根瘤菌数量较少^[32]。适宜的温度下微生物才能生长繁殖, 过高或过低的温度均不利于微生物的生长和繁殖, 这就可能造成不同温度贮藏下的次代植株苗期内生菌根瘤菌数量差异较大。

不适宜的贮藏温度可能会导致种子中的内生菌致死^[33], 在种子贮存过程中, 内生菌的活性的降低先于种子活力的降低^[34], 与种子的活力相比, 内生菌的活性更容易受温度、湿度等外部条件的影响, 其活力比种子活力低^[35-36]。苗阳阳^[18]在研究 25 ℃、25 ℃ 硅胶干燥、-4 ℃ 和 4 ℃ 贮藏方法下次代种子内生菌根瘤菌数量时, 其数量和本试验中次代植株内生菌根瘤菌数量有差异, 或因内生菌根瘤菌在苜蓿种子中的定殖数量可能会随着贮藏时间及条件的变化而降低, 也可能是因为内生菌根瘤菌存在于种子中但是未表现出来或在贮藏过程中次代种子内生菌根瘤菌进行再一次的增殖或衰减。

接种根瘤菌可有效促进紫花苜蓿早结瘤, 提高其产量和品质^[37], 本试验内生菌根瘤菌种子的次代植株结瘤竞争能力高于 CK, 两个内生菌根瘤菌菌株均可提高次代植株苗期的结瘤有效性和生长效应, 任安芝等^[38]也证明种子内生菌可以有效提高幼苗根长和苗高、生物量积累等, 祁娟^[31]将苜蓿种子内生菌根瘤菌分离纯化后回接的试管苗的结瘤指标、生物量均得到提高。本试验表明不同贮藏方法的种子内生菌根瘤菌可以高效传代, 根瘤菌传代后依然可以增加苜蓿植株生物量。但内生菌根瘤菌能否在苜蓿植株生殖生长期稳定生存, 并保持良好的促生效果, 是否可以继续传代至第三代种子中有待继续研究。

4 结论

适宜的贮藏方法有利于提高种子内生菌根瘤菌的传代能力和传代有效性, 在 4 种贮藏条件下, 苜蓿种子内生菌根瘤菌均可传代至次代植株苗期各部位, gn5f 内生

种子适宜 S1 贮藏, 可高效传代到次代植株共生结瘤, 固氮促生; 12531f 内生种子适宜 S2 贮藏, 可高效传代到次代植株共生结瘤, 固氮促生。在各贮藏条件下, 均可不同程度提高 gn5f、12531f 次代植株苗期的单株叶片数、株高、根长、生物量; gn5f 内生种子在 S1 贮藏, 可提高次代植株苗期的单株结瘤数、单株根瘤重、根瘤直径、根瘤等级; 12531f 内生种子在 S2 贮藏, 可提高种子植株苗期的单株结瘤数、单株根瘤重、根瘤直径、根瘤等级、固氮酶活性; 两种菌株稳定传代到下一代植株时均有向繁殖器官运移定殖的明显趋势。

参考文献:

- [1] 戚志强, 王永雄, 胡跃高, 等. 当前我国苜蓿产业发展的形势与任务[J]. 草业学报, 2008, 17(1): 107-113.
- [2] Mehboob I, Naveed M, Zahir Z A. Rhizobial Association with Non-Legumes: Mechanisms and Applications[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2009, 28(6): 432-456.
- [3] 李剑峰, 张淑卿, 师尚礼, 等. 苜蓿内生菌根瘤菌分布部位与数量变化动态[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(6): 1200-1205.
- [4] 苗阳阳. 外源物质对苜蓿内生菌根瘤菌运移定殖的影响研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- [5] Hardoim P R, Overbeek L S, Elsas J D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(10): 463-471.
- [6] 覃姚红. 玉米种子内生固氮菌的鉴定及其对小麦生长及抗旱能力影响的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [7] Ueno A C, Gundel P E, Seal C E, et al. The negative effect of a vertically-transmitted fungal endophyte on seed longevity is stronger than that of ozone transgenerational effect[J]. Environmental and Experimental Botany, 2020, 175.
- [8] Adam E, Bernhart M, Müller H, et al. The Cucurbita pepo seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding[J]. Plant and Soil, 2018, 422(1-2): 35-49.
- [9] Miller I M. Bacterial Leaf Nodule Symbiosis[J]. Advances in Botanical Research, 1990, 17(8): 163-234.
- [10] Liu Y, Zuo S, Xu L, et al. Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines[J]. Archives of Microbiology,

- 2012,194(12):1001-1012.
- [11] David J M,Raizada M N,Gilbert M T P. Conservation and Diversity of Seed Associated Endophytes in Zea across Boundaries of Evolution,Ethnography and Ecology[J]. Plos One,2011,6(6):e20396.
- [12] 赵震. 水稻种子内生细菌多样性分析及核心微生物组的界定[D]. 北京:中国农业科学院,2019.
- [13] 张丽辉,蒋远玲,张学凡,等. 变温与采后贮藏时间协同作用对紫花苜蓿种子萌发的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):313-316.
- [14] Gundel P E,Sorzoli N,Ueno A C,*et al.* Impact of ozone on the viability and antioxidant content of grass seeds is affected by a vertically transmitted symbiotic fungus[J]. Environmental and Experimental Botany,2015,113:40-46.
- [15] 李春杰,王彦荣,朱廷恒,等. 紫花苜蓿种子对逆境贮藏条件的反应[J]. 应用生态学报,2002(8):957-961.
- [16] 张远兵,刘爱荣,张雪平. 不同贮藏方法及激素、稀土等对牡丹种子发芽及幼苗生长的影响[J]. 种子,2005(8):16-20.
- [17] 孔祥辉,张海英. 低温冷冻真空干燥处理对韭菜种子的贮存效应[J]. 长江蔬菜,1999(3):27-29.
- [18] 苗阳阳,周彤,师尚礼,等. 贮藏方法对紫花苜蓿种子内生根瘤菌定殖的影响[J]. 草原与草坪,2018,38(2):13-18.
- [19] 苗阳阳,师尚礼,康文娟. 赤霉素对根瘤菌运移、定殖及苜蓿幼苗生长的影响[J]. 中国农业科学,2017,50(23):4545-4557.
- [20] Chi F,Shen S H,Cheng H P,*et al.* Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology[J]. Applied and environmental microbiology,2005,71(11):7271-8.
- [21] 霍平慧. 耐抑菌剂根瘤菌筛选及耐药菌株制备菌剂抑杂菌效果研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2014.
- [22] 李剑峰,张淑卿,师尚礼,等. 几种外源物质对内生根瘤菌侵染苜蓿芽苗并在植株体内运移的影响[J]. 草地学报,2015,23(6):1259-1264.
- [23] 张运婷,师尚礼,苗阳阳,等. 磷酸二氢钾对苜蓿幼苗体内根瘤菌运移及定殖的影响[J]. 草原与草坪,2018,38(3):40-49.
- [24] 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.
- [25] Zaied K A,Kosba Z A,Nassef M A,*et al.* Induction of Rhizobium inoculants harboring salicylic acid gene[J]. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 2009,3(2):1386-1411.
- [26] 柯春亮,戴嘉欣,周登博,等. 利用 T-RFLP 技术在施用解磷菌剂土壤中微生物群落多样性分析[J]. 安徽农业大学学报,2017,44(3):471-477.
- [27] 王金生,丁宁,吴俊江,等. 大豆根瘤菌接种效益及竞争结瘤能力分析[J]. 大豆科学,2017,36(5):761-767.
- [28] 张彩文. 不同基因型水稻内生细菌的群落结构及传播途径初探[D]. 北京:中国农业科学院,2017.
- [29] 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.
- [30] Hoch M,Kirchman D. Seasonal and inter-annual variability in bacterial production and biomass in a temperate estuary[J]. Marine Ecology Progress,1993,98(3):283-295.
- [31] 祁娟. 苜蓿种子内生根瘤菌筛选及其促生能力研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2006.
- [32] 孙力军,王超男,孙德坤,等. 植物内生菌 *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 菌株对苹果青霉病的抑制效果[J]. 安徽科技学院学报,2008(1):16-20.
- [33] 强晓晶. 破碱草内生真菌对小麦抗旱性的影响机制[D]. 北京:中国农业科学院,2019.
- [34] Vandegrift R,Blaser W,Campos-Cerda F,*et al.* Mixed fitness effects of grass endophytes modulate impact of enemy release and rapid evolution in an invasive grass [J]. Biological Invasions,2015,17(4):1239-1251.
- [35] Gundel P E,Martínez-Ghersa M A,Garibaldi L A,*et al.* Viability of Neotyphodium endophytic fungus and endophyte-infected and noninfected *Lolium multiflorum* seeds[J]. Botany-botanique,2009,87(1):88-96.
- [36] Gundel P E,Martínez-Ghersa M A,Batista W B,*et al.* Dynamics of Neotyphodium endophyte infection in ageing seed pools: incidence of differential viability loss of endophyte, infected seed and non-infected seed[J]. Annals of Applied Biology, 2010,156(2):199-209.
- [37] 罗彦昕. 紫花苜蓿根瘤菌接种效果研究[J]. 防护林科技,2020(6):19-21.
- [38] 苗阳阳,周彤,师尚礼,等. 贮藏方法对紫花苜蓿种子内生根瘤菌定殖的影响,2018,38(2):13-18.

Effects of storage methods on the transmissibility of endophytic rhizobia from alfalfa seeds

LIU Chang¹, SHI Shang-li¹, KANG Wen-juan¹, MIAO Yang-yang², WU Fang¹

(1. 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;

2. College of Animal Science & Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi

Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: Seed endophytic rhizobia migration is a new form of sustainable symbiosis system to promote the growth of alfalfa plants. In order to explore the effect of storage methods on the transmissibility of seed endophytic rhizobia, seeds were harvested from *Medicago sativa* cv. Gannong No. 5 plants which were inoculated with green fluorescent protein-labeled rhizobia gn5f (endogenous) and 12531f (exogenous). Before sowing, the seeds were stored for 3 years under the following conditions: 25 °C + natural humidity (S1), 25 °C + silica gel (S2), 4 °C + refrigerator humidity (S3) and -4 °C + refrigerator freezing humidity (S4). The control was the seeds harvested from alfalfa plants irrigated with sterile water. The sustainability and effectiveness of endophytic rhizobia were evaluated at the seedling stage of the subsequent generation. Results showed that gn5f and 12531f can be passed from seeds to the next generation plants. Under S1 condition, the number of gn5f colonized in the roots, stems and leaves of the next generation plants were significantly higher than that under other treatments ($P < 0.05$). At the seedling stage of the next generation plants, compared with the control, the nodule number per plant, nodule weight per plant, nodule grade, nitrogenase activity, leaf number, plant height, root length, above ground fresh weight, above ground dry weight, root fresh weight, root dry weight were increased by 37%, 1183.54%, 47.52%, 23909.07%, 38.72%, 40.63%, 33.82%, 68.11%, 137.73%, 223.70% and 600.00%, respectively. Under S2 condition, 12531f had the highest colonization number in the roots of the next generation plants (560.63 cfu/g). The nodule number per plant, nodule diameter, nodule grade, nitrogenase activity, leaf number per plant, plant height, root length, above ground fresh weight, above ground dry weight, root fresh weight, root dry weight were higher than those of control and increased by 37.90%, 21.33%, 27.01%, 288.21%, 41.22%, 39.40%, 36.04%, 72.37%, 144.58%, 284.05%, 872.04%, respectively. Appropriate storage methods contributed to the improvement of sustainability and effectiveness of seed endophytic rhizobia, but it varied with the species and source of rhizobia. Storage of gn5f-colonized seeds under S1 condition and 12531f-colonized seeds under S2 condition demonstrated higher transmissibility to the subsequent generation and better promotion of plant growth by efficient nodulation and nitrogen fixation. The next generation plants of 12531f-colonized seeds stored under S2 condition presented higher nodulation and growth parameters than that of gn5f-colonized seeds stored under S1 condition.

Key words: alfalfa; seeds; storage method; endogenous rhizobia; transmissibility