

苜蓿内生根瘤菌分布部位与数量变化动态*

李剑峰 张淑卿 师尚礼** 霍平慧

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

摘 要 为探明根瘤菌在苜蓿植株及其种子内的分布规律,对苜蓿植株及种子各部位在不同生育期内生根瘤菌的分布和数量变化进行了研究。结果表明:苜蓿植株内生根瘤菌的分布和数量在空间和时间上都具有很大异质性。空间分布上,不同部位组织的内生根瘤菌数量随植株光合产物源-库的运输方向呈逐渐增大的趋势,绝大部分内生根瘤菌分布于植株的根系,并主要分布于毛根,在主根内主要存在于表皮和皮层,中柱分布较少;在植株地上部分,内生根瘤菌主要在营养期末分布于花芽 $[8.6\sim 9.6\times 10^3\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})]$,在蕾期和花期分布于雌蕊子房的子房壁,在结荚期分布于荚果果皮 $(1.07\times 10^3\text{cfu}\cdot\text{pod}^{-1})$,在种子成熟期则主要存在于新生的种子中;茎内的根瘤菌数量在营养期和结荚期不足 $2\times 10^2\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$,而在蕾期和花期完全绝迹;叶片内则始终不存在根瘤菌。在时间上,结荚期根、荚果皮内的根瘤菌数量明显高于其他时期;花内各器官(不包括花梗)在授粉后根瘤菌数量迅速增加;由于子房向荚果发育的过程中,子房壁和胚珠内的根瘤菌数量随时间呈对数增长;胚珠在受精后即存在有内生根瘤菌,并且幼嫩种子内生根瘤菌数量远高于受精胚珠,证明内生根瘤菌能被转运并定殖在发育早期的种子中。两个苜蓿品种成熟种子在收获 120 d 后,根瘤菌数量比刚收获时分别增加 131.46 倍(“陇东”)和 11.76 倍(“游客”),说明根瘤菌进入种子后,仍然有一个继续繁殖增长的过程。

关键词 苜蓿 内生根瘤菌 生育期 器官

中图分类号: S154.4; S812; S41; S541 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2009)06-1200-06

Position and quantity of endogenous rhizobia in alfalfa plant

LI Jian-Feng, ZHANG Shu-Qing, SHI Shang-Li, HUO Ping-Hui

(College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University; Key Laboratory of Grassland Ecosystem of the Ministry of Education; Sino-US Center for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

Abstract To determine the distribution characteristics of rhizobium in alfalfa plants and seeds, the distribution and abundance of endogenous rhizobium in different parts and seed of alfalfa at different growth stages were analyzed. The result indicates significant spatial and temporal heterogeneity in endogenous rhizobium abundance in alfalfa plant. For the spatial distribution, rhizobium abundance gradually increases with source-sink transportation trend of plant photosynthate. Most endogenous rhizobia are distributed in alfalfa root, mainly in the hair roots. In main root, more endogenous rhizobia exist in the epidermis and cortex areas compared with stele. Regarding the above-ground plant parts, endogenous rhizobia are mainly distributed in flower buds at vegetative stage $[8.6\sim 9.6\times 10^3\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})]$, and in ovary walls of pistils at budding and floral stage. For pod-bearing stage, endogenous rhizobia are mainly in the pericarp of legumes $(1.07\times 10^3\text{cfu}\cdot\text{pod}^{-1})$, and in newborn seeds at mature stage. Rhizobium abundance in stalk is less than $2\times 10^2\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$ at vegetative and pod-bearing stages, which vanishes at budding and floral stages. Rhizobia are not found in leaves. Temporally, rhizobium abundance in root and pericarp is obviously higher at pod-bearing stage than any other growth stage. Rhizobium abundance in various floral organs (except pedicle) rapidly increases after pollination. During ovary-to-legume germinative process, rhizobium abundance in ovary wall and ovule increases logarithmically. Endogenous rhizobia are found in ovule only after fertilization, and rhizobium abundance in young seeds is higher than in fertilized ovule. This implies that endogenous rhizobia can be transported and colonized in early germinated seedlings. Rhizobium abundance in mature seeds of the two alfalfa varieties

* 国家科技支撑计划项目(2007BAD52B06、2006BAD04A04、2006BAD01A19)、农业部行业专项(nyhyzx07-022)和现代农业产业技术体系建设专项资金资助

** 通讯作者: 师尚礼(1962~), 男, 汉族, 教授, 博士生导师, 主要从事牧草种质资源方面的研究。E-mail: shishl@gsau.edu.cn

李剑峰(1979~), 男, 汉族, 在读博士, 主要从事草坪草及牧草种质资源、植物内生菌和微生物制剂方面的研究。E-mail: ljfsmart@qq.com

收稿日期: 2009-01-28 接受日期: 2009-04-29

stored for 120 d after harvest are 131.46 (“Longdong”) and 11.76 (“Eureka”) times higher than in newly harvested seeds. This suggests continuous proliferation of rhizobia after seeds are infested.

Key words Alfalfa plant, Endogenous rhizobium, Growth stage, Organ

(Received Jan. 28, 2009; accepted April 29, 2009)

植物内生菌指分布于无外在感染症状的健康植物组织内,能在植物组织中定殖与运转,对植物无害甚至有益的微生物^[1]。植物内生菌在植物体内有稳定的生存空间,可有效地提高宿主植物的生存能力和抗病能力,并与宿主植物协同进化,彼此形成稳定的生态关系^[2]。内生细菌已发现约 50 属^[3],其中不乏具有抗逆、固氮并能产生植物生长促进剂的菌株。杨海莲^[4]等分离出的内生固氮细菌 MR12 兼有固氮和防病作用。Baldani 等^[5]研究发现,植物内生固氮菌可定殖在植物内部,并与植物宿主联合固氮。有研究表明,感染内生菌的植物宿主往往具有生长快速、抗逆境、抗病害、抗动物危害等优势,比未感染植株更具生存竞争力^[6]。崔林等^[7]从马铃薯块茎中分离出的内生细菌能在平板培养中拮抗环腐病菌。祁娟等^[8]从苜蓿种子内分离出的根瘤菌(*Rhizobium*)具有固氮、溶解无机磷和分泌生长素的作用。

随着研究领域的不断拓宽和研究方法的不断深入,因在农业和医药领域的巨大应用潜力,内生菌已逐渐成为国内外研究的热点。但内生菌多属异养生物,依靠植物提供的养分生存,除可通过种子传播外,还可通过气孔、水孔和皮孔等进入植物体内,或通过昆虫传播和再分布,甚至由根际真菌的携带达到重新分布的目的^[6]。因此,内生菌在植株体内的分布和数量不是恒定的,会随环境而改变^[9],呈现时间及空间上的差异。目前已有的研究主要集中在内生菌的分离和菌种的利用方面,而对某一特定菌种在植物体内的分布动态却少有报道。本试验拟通过对苜蓿内生根瘤菌在宿主植株各部位及不同生育期内的分布和数量变化的研究,了解根瘤菌在苜蓿植株及其种子内的分布规律,为内生菌的利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况与试验材料

1.1.1 试验地概况

试验于 2004 年在甘肃农业大学兰州牧草实验站内进行,该站位于兰州市西北部,东经 102°36′,北纬 35°34′,海拔 152.5 m,年均降水量 330 mm,年平均日照时数 2 446 h,全年无霜期 180 d 以上。土质为砂壤, pH 8.09,速效氮 105 mg · kg⁻¹,速效磷 25.32 mg · kg⁻¹。

1.1.2 供试材料

2 个供试苜蓿品种已生长 3 年,分别为甘肃本地

品种“陇东”(*Medicago sativa* L. Longdong)和引进美国的品种“游客”(*M. sativa* L. Eureka)。植株生长健壮无病虫害,营养期取样时平均株高分别为 120 cm 和 147 cm。每品种 3 个种植小区,每种植小区 6 m²,种植密度 12 株 · m⁻²。

表面处理药剂:碘伏(聚乙烯吡咯烷酮碘)消毒液,有效碘数量为 2 500 mg · L⁻¹; ST 液含 0.9% NaCl、0.5%吐温 80 和 0.5%硫代硫酸钠,有清除植物材料表面的污物、抑制抑菌剂活性的作用。

试验用培养基为 YMA 刚果红培养基,含甘露醇 10.0 g · L⁻¹, NaCl 0.1 g · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g · L⁻¹, 酵母粉 1.0 g · L⁻¹, K₂HPO₄ 0.5 g · L⁻¹, 琼脂 15~20 g · L⁻¹, 0.5% 刚果红液 4 mL · L⁻¹, 蒸馏水 1 L · L⁻¹, pH 7.0~7.2。

1.2 研究方法

1.2.1 植物材料的取样、表面消毒及组织器官的分离

分别于营养期、现蕾期、花期和结荚期在每个苜蓿品种的 3 个种植小区内各随机取 1 株植株(共 3 株),连根挖起后清洗整株,晾干表面明水后用无菌剪刀分离为根、茎、叶、茎尖 4 部分,用无菌手术刀自花芽(花芽仅在营养期取样)与植株的连接处将花芽切下。将分离出的组织材料称取 1 g 置于无菌三角瓶中,加碘伏溶液震荡灭菌 5 min 后用无菌水冲洗 5 次,再加入无菌 ST 液洗涤 1 min,无菌水冲洗 5 次,以上过程对主根、叶片和茎重复两次,对茎尖及花芽进行 1 次。冲洗后再将主根用手术刀解剖分离为中柱和皮层(包括内外皮层和表皮)。

植株的花蕾、花或荚果分别在现蕾期、花期及结荚期用无菌手术刀自花梗(荚果梗)与植株连接的部位与植株分离,并以上述方法表面消毒,其中碘伏溶液消毒时间为 3 min。在无菌工作台内晾干明水后置于解剖镜下,用手术刀先将花梗(荚果梗)切下,再用无菌解剖针将花瓣去除,将花蕾(花)分离为花药(花粉)、花丝、雌蕊和花托,将雌蕊在解剖镜下再分离为柱头、花柱和子房,最后取部分发育良好的子房,将子房壁小心剖开,取出其中的胚珠。荚果则用解剖针挑开,取出其中的幼嫩种子,幼嫩种子和荚果皮分别置于无菌离心管中备用。

花期未受精胚珠与受精胚珠的判别:参照陈宝书的方法^[10]以花的形态特征及龙骨瓣的位置判断花是否已授粉,并在 40~100 倍显微镜下观察雌蕊是否产生到达胚珠的花粉通道来判断胚珠受精与否。

成熟的荚果于种子收获期于种植小区内随机采集^[11]。剥开荚果后将种子置于室温保存, 120 d 后取出, 以相同的方法进行表面消毒(碘伏灭菌 5 min, 无菌水冲洗 5 遍), 在培养皿内加 5 mL 无菌水浸泡 12 h, 待种皮泡软时用解剖针和手术刀将种胚、子叶和种皮剥离, 子叶及种胚剥离后用无菌水冲洗 5 遍备用。

以上过程除室外采样及植株表面清洗外均在无菌条件下完成, 花内组织和种子等细微结构的解剖和分离均在解剖镜下进行。

1.2.2 植物组织中内生根瘤菌的分离和数量测定

将分离出的茎、叶、茎尖、花芽, 毛根、侧根及主根(主根已分离为皮层和中柱两部分)各称取 1 g, 加 2 mL 无菌水在研钵中研磨均匀。以 10 枚花或荚果为 1 个样品单位, 将花梗(荚果梗)及从花蕾、花和荚果内分离出的花药、柱头、子房等组织分别加 1 mL 无菌水研磨。以上处理 3 次重复。将研磨得到的组织匀浆 2 mL 转入 20 mL 刻度试管, 加无菌水至刻度后配制成原液 1×10^{-1} 浓度的稀释液, 取该稀释液 1 mL 加无菌水 9 mL 配制 1×10^{-2} 浓度的稀释液, 并依次配制 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 的稀释液。每浓度 3 次重复, 离心($4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min)后取上清液 0.2 mL, 稀释平板法涂抹至含刚果红的 YMA 培养基上。将涂抹后的平板置于生化培养箱中 28℃ 培养 48 h 后, 参照黄宝灵的方法^[12](根瘤菌单菌落在 YMA 刚果红培养基上不吸附色素, 圆形, 边缘光滑, 中间隆起呈黏质半透明状, 并在结晶紫培养基上正常生长)区分并记录每皿的根瘤菌单菌落数量。以林稚兰的方法^[13]选择菌落均匀、约每平板 30~300 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数。并取每培养皿中的典型菌株分离纯化培养后编号保存。

1.2.3 内生根瘤菌的回接鉴定

将初步分离纯化后保存的根瘤菌株接入 YMA

固体平板培养基活化 24 h, 再转入 YMA 液体培养基, $120\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、28℃ 摇床培养至培养液光密度值 ($\text{OD}_{600\ \text{nm}}$ 值) ≥ 1 时, $10\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 抛去上清液后用无菌水洗下菌体, 摇匀打散后用无菌水调制成 $\text{OD}_{600\ \text{nm}}$ 为 0.5 的菌悬液。用该菌悬液浸泡表面消毒后发芽的苜蓿种子 30 min, 将浸泡后的种子植入灭菌后的试管蛭石中, 剩余菌液加入装有蛭石的试管中, 加盖棉塞, 置于培养室中培养 8~10 d, 去掉棉塞, 自然培养。每个菌株 3 个试管, 每试管植入 5 粒种子作为重复, 以无菌水代替菌液处理为对照。培养条件: 光照度 7 000~8 000 lx, 光照时间 $12\ \text{h} \cdot \text{d}^{-1}$, 有光照温度 21~25℃, 无光照温度 16~20℃, 相对湿度 50%~70%。接种 45 d 后取出苜蓿植株测算单株根瘤数和结瘤率, 将无结瘤能力的菌株判定为非根瘤菌或无效根瘤菌, 本文数据所涉及的根瘤菌菌株均已经过上述方法鉴定。

1.3 数据处理

根、茎、叶、茎尖、花芽数据以每克组织为单位, 花梗(荚果梗)及花(荚果)内各部位组织以 1 枚花(荚果)为单位, 胚珠或种子每 10 粒为 1 个单位(1 枚花或荚果内平均含有约 10 粒胚珠或种子)。数据处理采用 DPS 统计软件以 LSD 法进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同时期植株地下部分各部位内生根瘤菌数量

由表 1 可见, 内生根瘤菌在两个苜蓿品种根部的各个部位均有分布, 且分布规律基本一致, 即内生根瘤菌在各个时期均主要存在于毛根内, 平均最高菌数达到 $5.1 \times 10^7\ \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$; 侧根及主根内的根瘤菌数量则不足毛根组织菌数量的 0.2%。这说明毛根为根瘤菌在植株地下部分的主要存在部位, 这可能与毛根表面积较大有关。侧根和主根内的根瘤菌数量相近, 主根内根瘤菌则主要分布于根表皮和皮层,

表 1 不同时期苜蓿根部内生根瘤菌数量
Tab. 1 Endogenous rhizobia amount in alfalfa root in different growth stages

检测部位 Optimum part	生育时期 Growth stage	根瘤菌数量 Endogenous rhizobia amount [$\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW})$]		
		陇东 Longdong	游客 Eureka	平均 Average
主根表皮及皮层 Epidermis and cortex of main roots	营养期 Vegetative stage	810	130	470
	盛花期 Florescence stage	252	280	366
	结荚期 Bearing pod stage	4 786	2 090	3 438
主根中柱 Stele of main roots	营养期 Vegetative stage	106	22	64
	盛花期 Florescence stage	78	25	52
	结荚期 Bearing pod stage	708	390	549
侧根 Lateral roots	营养期 Vegetative stage	848	673	761
	盛花期 Florescence stage	1 438	520	979
	结荚期 Bearing pod stage	6 120	3 326	4 723
毛根 Hair roots	营养期 Vegetative stage	707 546	990 212	848 879
	盛花期 Florescence stage	732 532	874 796	803 664
	结荚期 Bearing pod stage	3 196 370	7 037 810	5 117 090

同时期主根中柱内的根瘤菌平均数量均仅为皮层和表皮内根瘤菌数量的 10.0%~16.8%，这与刘成运等^[14]的研究结果不同，即百合根系中的内生菌主要分布于主根的中柱，而在皮层及表皮层分布较少。

不同生育时期各部位内生根瘤菌数量差异较大，结荚期根各部位的菌数最高，主根及毛根在盛花期和营养期时的菌数量仅为结荚期时的 9.5%~16.6%，而侧根在营养期、盛花期的平均根瘤菌数量亦仅为结荚期的 16.1%~20.7%。

2.2 不同时期苜蓿植株地上部分各部位内生根瘤菌数量

从表 2 可以看出，苜蓿植株地上部分(不计花与荚果) 仅在茎和花芽内携带有内生根瘤菌，叶片中虽有大量杂菌存在，但无根瘤菌检出，茎尖内则无任何可培养的菌落检出。苜蓿植株茎内仅在营养期和结荚期有根瘤菌存在，且两个时期的根瘤菌数目相对稳定。而在蕾期与花期只有杂菌而无根瘤菌存在。花芽在营养期末形成，内含有大量的根瘤菌，“陇东”和“游客”两品种植株花芽内的根瘤菌数量分别为同时期茎内生根瘤菌数量的 66.2 倍和 114.3 倍。对各生育期两品种地上部分和根总根瘤菌数量的调查发现，两苜蓿品种植株地上部分的平均总根瘤菌数量在营养期、盛花期和结荚期仅为根的

0.14%、0.037%和 0.009 2%，且根瘤菌在茎内的分布在时间上也是不连续的。这与龙良鲲等^[15]的研究结果类似，即生防菌 01-144 在番茄植株根内的定殖能力大于茎，茎中的 01-144 菌定殖动态也呈由增到减的趋势。这一现象说明内生根瘤菌同多数内生细菌一样能在植物体内转移，并对特定的部位有所偏好^[16]。

2.3 授粉前后苜蓿花各部位内生根瘤菌数量

苜蓿为异花授粉植物，开花前雌蕊保持未授粉状态，此时的花药和柱头均无根瘤菌存在(图 1a)。而在雌蕊柱头以下部分，即花柱和子房内有根瘤菌分布，花托和花梗内亦有少量根瘤菌存在。两苜蓿品种子房内的根瘤菌数量最高，平均根瘤菌数量分别为花柱、花梗和花托的 226.3%、211.1%和 554.0%，差异极显著($P<0.01$)；花托内的平均根瘤菌数量最低，仅为花柱和花梗内根瘤菌数量的 42.1%和 38.1%。

授粉后，子房根瘤菌数量达到 $21.4\text{ cfu}\cdot\text{flower}^{-1}$ ，迅速增高到授粉前的 497.7%，花柱和花托内的平均根瘤菌数量亦分别增加到授粉前的 210.5%和 366.7%(图 1b)。与其他组织不同的是，花梗在授粉后无根瘤菌检出。

授粉前后花内组织根瘤菌数量变化表明，根瘤菌在子房中的积累速度明显快于其他部位。柱头内的根瘤菌来源可以推测为由花粉带入，随着花粉管

表 2 不同时期苜蓿植株地上部分内生根瘤菌数量
Tab. 2 Endogenous rhizobia amount in alfalfa shoot in different growth stages

品种 Variety	生育时期 Growth stage	内生根瘤菌数量 Endogenous rhizobia amount [cfu · g ⁻¹ (FW)]			
		茎 Stem	叶片 leaf	茎尖 Stem tip	花芽 Flower bud
陇东 Longdong	营养期 Vegetative stage	130	+	—	8 600
	蕾期 Squaring stage	+	+	—	
	花期 Florescence stage	+	+	—	
	结荚期 Bearing pod stage	170	+	—	
游客 Eureka	营养期 Vegetative stage	84	+	—	9 600
	蕾期 Squaring stage	+	+	—	
	花期 Florescence stage	+	+	—	
	结荚期 Bearing pod stage	80	+	—	

“+”表示无根瘤菌，但有其他菌检出；“—”表示无任何可培养菌种检出。“+”means no rhizobia but other bacteria exists; “—” means no bacteria exists.

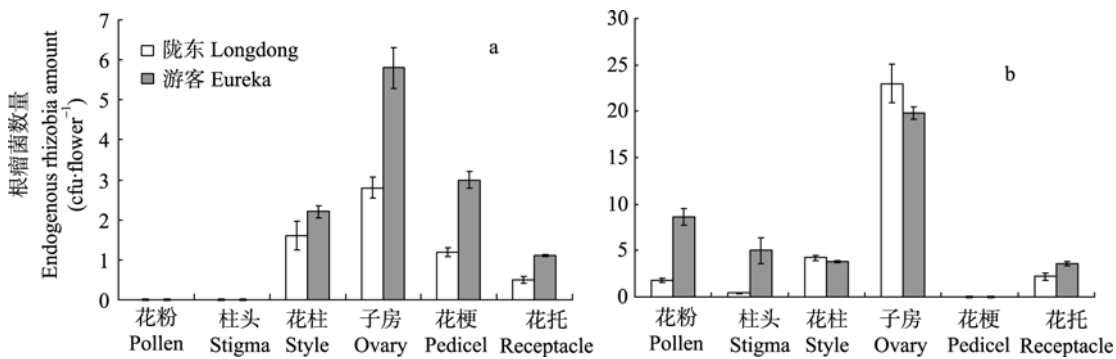


图 1 授粉前(a)、后(b)苜蓿花各部位内生根瘤菌数量
Fig. 1 Endogenous rhizobia amount in flower tissues before (a) and after (b) pollination of alfalfa

的生长进入柱头组织,但花粉中的根瘤菌来源尚不明确,试验中分离出的花丝在授粉前后均不曾携带任何可培养菌,也有可能是材料处理过程中花丝较其他组织更易被消毒液渗透,其内含菌被杀灭所致。授粉后,两苜蓿品种柱头和花粉内的根瘤菌从无到有迅速增加,刘成运^[13]等对百合花药和花粉的切片染色后观察发现,花药横切片内部绒毡层及药室的小孢子母细胞中尚未出现细菌,而在成熟的花粉粒中有细菌分布,这与本试验的结果一致。柱头内根瘤菌的变化与花粉内的变化趋势一致,因此,可以推测花粉携带的根瘤菌随着花粉在柱头上的萌发而进入柱头组织。

2.4 苜蓿荚果及种子各发育时期内生根瘤菌数量的变化

苜蓿荚果发育过程中,花内的胚珠受精后发育为种子,子房壁发育为荚果皮。这一过程中,子房壁(荚果皮)内生根瘤菌数量呈先升后降趋势,在结荚期达到最大值,随着种子成熟,荚果皮逐渐失水木质化,根瘤菌数量降低而杂菌数量增大。结荚期荚果皮内的平均根瘤菌数量分别为蕾期、盛花期和种子成熟期的 419.25 倍、87.63 倍和 4.03 倍,差异均达极显著水平($P<0.01$);胚珠(种子)发育过程中根瘤菌数量的变化趋势与子房壁相似,但胚珠在未受精前不含任何菌类,受精后胚珠内生根瘤菌从无到有,至结荚期根瘤菌数量接近最大值并趋于稳定,平均根瘤菌数量为胚珠初受精(盛花期)的 26.84 倍,种子成熟期根瘤菌数量与结荚期差异不显著(图 2)。

2.5 种子收获后各部位内生根瘤菌数量

两苜蓿品种收获 120 d 的种子中,根瘤菌主要分布于种皮,其平均数量约为种胚和子叶的 359.84 倍和 515.22 倍。种子浸泡液内亦含有大量根瘤菌,其数量与种皮接近。将干燥种子剖开并去除种胚后浸泡种皮,发现种皮浸出液的根瘤菌数量与种子浸泡液的根瘤菌数量处于同一数量级,而高于胚轴及子叶根瘤菌数量 $10^2\sim 10^3$ 倍,这说明种子浸泡液中的根瘤菌绝大多数来自于种皮(图 3)。

综合以上结果可以看出,种子中的内生根瘤菌主要来自种皮,数量高于 3.54×10^2 cfu \cdot 10grains⁻¹ (“游客”)和 5.85×10^4 cfu \cdot 10grains⁻¹ (“陇东”)。经计算,与刚收获的种子相比,“陇东”苜蓿的种子室温下放置 120 d 后根瘤菌数量增加 131.46 倍,而“游客”的种子则增加 11.76 倍。这说明种子在荚果成熟后的一段时期内生根瘤菌数量仍在快速增加,故初收获的种子内尤其是种皮内的环境适宜于根瘤菌的存活和繁殖。

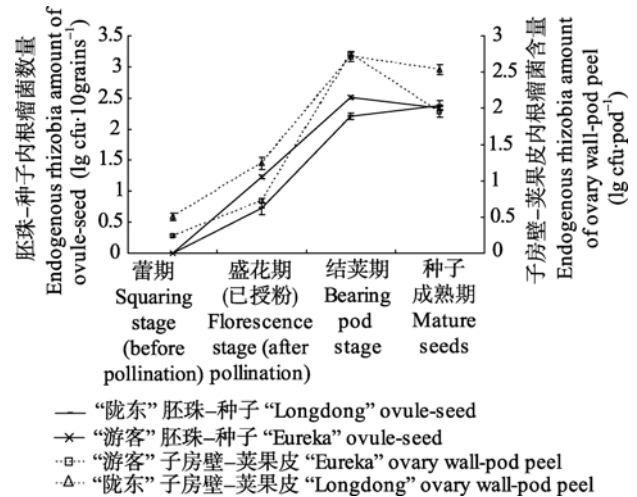


图 2 荚果及种子在发育过程中的根瘤菌数量
Fig. 2 Endogenous rhizobia amount in pods and seeds during seeding process of alfalfa

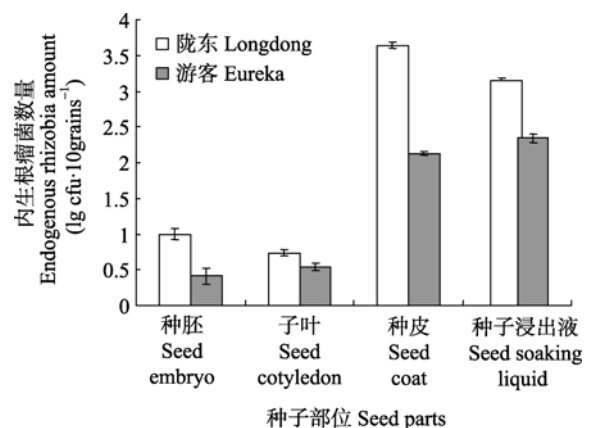


图 3 收获后常温储存 120 d 后苜蓿种子浸泡液及种子各部位的根瘤菌数量
Fig. 3 Endogenous rhizobia amount in every part and soaking liquid of alfalfa seeds stored for 120 d after harvest under normal temperature

3 结论和讨论

两个品种苜蓿植株内生根瘤菌的分布和数量在空间和时间上都具有很大的异质性。在空间上,植株内绝大部分的内生根瘤菌分布于根系,仅不足 10% 的根瘤菌分布于植株地上部分。根系中根瘤菌主要分布于毛根,侧根和主根内的根瘤菌数量不足 0.92%。而在主根内主要存在于表皮和皮层,中柱内的菌数量较少。植株地上部分的内生根瘤菌则主要在营养期末分布于花芽,在蕾期和花期分布于雌蕊子房的子房壁,在结荚期分布于荚果皮,在种子成熟期则主要存在于新生的种子中。茎内的根瘤菌数目极少,不足 2×10^2 cfu \cdot g⁻¹(FW),甚至在蕾期和花期绝迹。空间分布上的异质性首先说明内生根瘤菌对于植株各部位组织环境内的偏好程度并不相同,营养丰富的部

位相对数量较高,如子房、种子和根部,而在光合产物的生产和运输部位,如茎和叶则很少或没有分布,这一结果与龙良鲲等^[15]的研究结果一致,即内生菌虽能在植物体内转移,但对某些特定部位有其偏好。袁保红等^[11]的研究结果证明,植物不同部位的微环境如通气状况、生物酶和其他化学成分使不同的内生菌在植物不同器官和组织中占据不同的生态位。许褪森^[17]也提出,植物组织中可利用碳源的多少直接限制了内生固氮菌固氮酶基因的表达。结合以上观点推断,内生根瘤菌随植株源-库的运输方向而逐渐增大的趋势也许与根瘤菌作为异养生物,需要耗费宿主植物大量营养的特性相关联。但同一植株内并非只有一种根瘤菌,要明确植株内某一特定菌株的分布和数量变化规律,则需要进一步利用标记菌株进行示踪试验。

在时间上,结荚期的根、荚果皮内根瘤菌数量明显高于其他时期,花内各器官(不包括花梗)授粉后根瘤菌数量迅速增加。在子房向荚果发育的过程中,子房壁和胚珠内的根瘤菌数量随时间呈对数增长,幼嫩种子内生根瘤菌数量远高于受精胚珠。这些结果与 Coombs 和 Franco 的研究结果一致^[18],即在小麦种子的胚芽和胚乳中能找到在母体植株中内生定殖的标记菌,证明内生菌能被转运并定殖在发育早期的种子中。两个苜蓿品种成熟的种子在收获 120 d 后,根瘤菌数量比刚收获时分别增高 131.46 倍(“陇东”)和 11.76 倍(“游客”)。说明根瘤菌进入种子后,仍有一个继续繁殖增长的过程,这一过程可能会有正负两方面的效应,首先根瘤菌的繁殖需要消耗大量的营养和能量,对于种子的储藏年限和生活力不利;另一方面,种子在陌生环境萌发后,种子内生根瘤菌的大量存在为种子-根瘤菌这一共生体系的继续存在提供了物质基础,对次代植株的生长和发育有积极意义,这也是根瘤菌-植株这一共生体系长期进化的结果。祁娟^[19]的研究结果表明,同一苜蓿品种种子贮藏 5 年之内,种子内生根瘤菌的数量随着贮藏年限的增长而增加,5 年以后则随着贮藏年限的延长数量逐渐减少。

次代种子和植株内生根瘤菌的最终来源目前还不明确,是由根际侵入根系后再转运至种子的土壤根瘤菌,还是上代或是多代前种子中存在的内生根瘤菌,或二者兼有?这一问题目前尚无确定结论的相关报道,亟需深入的研究探讨,这对

于根瘤菌-寄主植物固氮共生体系的进化研究和根瘤菌接种的应用实践将会有深远的意义。

致谢 本研究得到甘肃农业大学草业学院姚拓教授、柳小妮教授和刘建荣老师的指导帮助,在此表示衷心的感谢!

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] Stamford T., Stamford N. P., Coelho L. C., et al. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves[J]. Bioresearch Technology, 2002, 83 (2): 105-109
- [4] 杨海莲, 王云山. 水稻内生沟肠杆菌 MR12 的鉴定及其固氮和防病作用研究[J]. 植物病理学报, 2001, 31(1): 92-93
- [5] Baldani J., Olivares F. Nitrogen-fixing entophytes: Recent advances in the association with graminaceous plants grown in the tropics [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997: 203-206
- [6] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881-892
- [7] 崔林, 孙振, 孙福在, 等. 马铃薯内生细菌的分离及环腐病拮抗菌的筛选鉴定[J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 353-358
- [8] 祁娟, 师尚礼. 不同品种紫花苜蓿种子内生根瘤菌溶磷和分泌生长素能力[J]. 草原与草坪, 2006 (5): 18-20
- [9] 王瑶瑶, 韩烈保, 曾会明. 禾本科植物内生菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2008 (3): 34-38
- [10] 陈宝书. 牧草饲料作物栽培学[J]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 182-184
- [11] 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]. 广东药学院学报, 2007, 23(3): 307-311
- [12] 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
- [13] 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, 2000: 151-153
- [14] 刘成运, 李广彦. 百合组织中细胞内生菌的分布与传播[J]. 武汉植物学研究, 1989, 7(2): 101-105
- [15] 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
- [16] 卢镇岳, 杨新芳, 冯永君. 植物内生细菌的分离、分类、定殖与应用[J]. 生命科学, 2006, 18(1): 91-94
- [17] 许褪森. 内生固氮菌研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 4828-483
- [18] Coombs J. T., Franco C. M. Visualization of an entophytic *Streptomyces* species in wheat seed[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(7): 4260-4262
- [19] 祁娟. 苜蓿种子内生根瘤菌筛选及其促生能力研究[D]. 甘肃农业大学, 2006: 23-25