

doi: 10.7541/2020.150

结合态氮对满江红内生细菌群落组成和结构的影响

陈坚* 陈彬* 郑斯平 郑益平 朱炳耀 郑伟文

(福建省农业科学院生物技术研究所, 福州 350003)

摘要: 研究从超微结构和分子水平上探讨结合态氮对满江红(*Azolla*)叶腔中以共生藻占优势的微生物群落的影响。为排除外源污染并保留其内生菌的多样性, 采用茎尖组织培养并添加结合态氮等方法, 取得了表面无菌的含藻满江红(AmA)和无藻满江红(AmB)。电镜观察揭示, AmB较AmA的萍体表型有某种程度的修饰。AmA的微生物群落结构以共生藻、内生菌和宿主腺毛及其分泌物组成的生物被膜和藻囊为主要特征, 而AmB的叶腔几乎中空。基于16S rRNA基因和*nifH*基因的高通量测序结果显示, 生长于无氮培养液的AmA样品的微生物群落有相当高的多样性, 共有17个可操作分类单元(OTU), 分属4个细菌门, 并有一个以*Nostoc azollae*为优势的固氮微生物亚群包括草螺菌、根瘤菌和*Niveispirillum*等。而生长于富含结合态氮培养液的AmB样品的群落多样性明显降低, 仅有8个OTU, 且以*Nostoc azollae*为优势的上述固氮微生物亚群全部消失。研究结果表明, 通过调整氮素营养, 可改变宿主植物的微生物群落组成与结构, 进而改良植物的生长发育。

关键词: 满江红; 蓝细菌; 满江红念珠藻; 微生物群落; 高通量测序; 电子显微镜

中图分类号: Q178.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2020)06-1287-10

水生蕨类植物满江红(*Azolla*)广泛分布于温带和热带淡水生态系统。满江红俗称红萍、绿萍, 因富含氮素和蛋白质等营养成分, 在亚洲农村被用作绿肥和饲料已有数百年历史^[1, 2]。这种细小的植物繁殖快, 生物量高, 归因于其叶腔中栖息着一种固氮蓝藻。固氮蓝藻是属于革兰氏阴性细菌的光自养原核生物, 故又称蓝细菌(Cyanobacterium)。与满江红共生的蓝藻形态酷似念珠藻(*Nostoc*), 一般称为满江红念珠藻(*Nostoc azollae*), 是由多个细胞串联成的丝状体, 含有营光合作用的营养细胞和专司固氮的异形胞。异形胞含有编码固氮酶的*nif*基因, 可将大气氮转化为植物可利用的结合态氮, 以NH₄的形态满足宿主生长对氮素的需求。宿主则以蔗糖为主的碳源作为回报^[3, 4]。研究表明, 添加结合态氮无助于满江红的生长, 甚至危及共生蓝细菌的生存^[1]。这是因为结合态氮的存在不仅不利于蓝细菌的营养细胞分化为固氮的异形胞, 而且会抑

制异形胞的固氮功能^[5-8]。

自20世纪70、80年代曾经的“红萍热”以来, 本实验室和国内外的研究机构对满江红-蓝细菌共生固氮的基础生物学进行了多年持续的研究, 发现并证实满江红在长期的进化过程中形成了特殊构造, 专供蓝藻栖息的叶腔和腺毛^[9]。腺毛有两种: 发生于满江红叶原基的初生分支腺毛(Primary branched hair, PBH; 由一个基细胞和多个端细胞组成)和形成于叶腔的次生单支腺毛(Secondary single hair, SSH; 仅由一个基细胞和一个端细胞构成)^[10]。它们不仅是宿主与共生藻进行氮、碳等物质交换和信号传递的特殊结构, 又是共生藻在满江红的无性繁殖阶段从茎尖向叶腔, 从母体向幼体进行水平转移的纽带; 也是共生藻在满江红的有性繁殖阶段从茎尖向孢子果, 从亲代向子代进行垂直转移的桥梁^[4, 11-13]。满江红的这些特殊构造给共生藻以稳定和封闭的生存空间, 让蕨与藻终生相伴, 使两者共生关系世

收稿日期: 2019-11-04; 修订日期: 2020-05-17

基金项目: 福建省科技计划项目(2017N1001); 福建省农科院科技计划项目(A2012-2); 福建省自然科学基金(2017J01053)资助 [Supported by the Fujian Provincial Project of Science and Technology (2017N1001); the Program for Science and Technology Research of Fujian Academy of Agricultural Sciences (A2012-2); the Provincial Natural Science Foundation of Fujian (2017J01053)]

作者简介: 陈坚(1965—), 男, 博士; 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: chenjian3@hotmail.com; 陈彬(1978—)女, 博士研究生; 主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: chenbinice@hotmail.com *共同第一作者

通信作者: 郑伟文(1942—), 男, 研究员; 长期从事植物-微生物互作研究。E-mail: bcfaas01@hotmail.com

代永续。这正是满江红有别于地球上现有的植物-微生物共生固氮体系的独特之处^[14]。随着满江红及其共生蓝藻全基因组测序的完成,以满江红作为模式植物,进行植物-微生物相互作用和微生态研究已日益受到学术界的关注^[8, 15, 16]。

近30年来,人们先后从满江红的叶腔发现并分离培养出其第三个共生伙伴——细菌。它们与固氮蓝藻一起构成了满江红叶腔内的微生态系统。而早在20世纪90年代,6个国家9个实验室的研究者均以自然界的满江红作为研究满江红内生细菌的材料,采用传统的平板培养法,从4个生物种的满江红中分离鉴定出9个属15个种的内生细菌^[17, 25]。本实验室郑伟文等^[12]用电子显微镜证明自然界的满江红和人工培养的无藻满江红均有伴生细菌。Nierzwicki等^[20, 21]应用电镜技术将满江红叶腔内生细菌分为6个超微结构类型。这些研究均从形态结构方面反映了内生细菌的多态性。进入21世纪后,随着分子生物学技术的进步,美国Raensallae大学的Lechno等^[26]用rDNA-PCR等方法从卡洲满江红的叶腔中分离鉴定出根癌农杆菌、根瘤菌等4种细菌。本实验室郑斯平等^[27]用PCR-DGGE和电镜技术对满江红的叶腔和孢子果内细菌的进行了检测和观察,揭示了小叶满江红叶腔以变形菌门为主的多种可培养和不可培养的细菌,把对满江红内生菌的表型多样性的研究推进了一步。随后,郑斯平等^[28]将小叶满江红的内生菌经16S rDNA-PCR扩增后用T-RFLP技术和PAT软件分析,通过比对确定这些内生菌属于10科42属。

本文报道用高通量测序和电子显微镜技术研究结合态氮对满江红体内以共生蓝细菌为优势的内生细菌群落的遗传组成和物理结构的影响,及其对满江红形态建成的间接效应,试图为通过内生菌群落结构的调节进而改变宿主的生长发育提供新的线索与思路。

1 材料与方法

1.1 材料来源与制备

本研究的实验材料为小叶满江红(*Azolla microphylla* Kaulfus), 早先从国际水稻研究所(International Rice Research Institute)引进, 原编号为IRRI 4018。

表面灭菌的满江红制备 为了排除外源细菌等微生物的干扰, 参照白克智等^[29]的茎尖培养法, 略有修改, 具体如下: 取100 g(鲜重)在自然条件下生长的萍体, 用自来水清洗, 去掉黏附的土壤等杂物, 细心剪去根系。后选取健康的萍体再用无菌水

清洗。捞取洗净的健康萍体, 置于灭菌的烧杯中, 加入适量的0.1%升汞溶液, 将萍体浸没, 用灭菌的镊子连续搅拌3min30s, 使满江红的叶、茎和幼根充分与溶液接触, 以确保灭菌效果。随后倾尽升汞溶液, 迅速用无菌水清洗经灭菌的萍体, 至少清洗4次, 每次3min, 尽量洗去残留在萍体上的升汞。在立体解剖镜下用无菌的细针挑取并弃去包被茎尖的叶片, 仅保留茎尖分生组织和1—2个叶原基, 后投入灭菌的IRRI无氮培养液的三角瓶内。IRRI培养液的配方为(mg/L): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 89; K_2SO_4 89.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 147; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 405.3; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.8; $\text{Na}_2\text{Mo}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.38; H_3BO_3 1.14; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.04; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04; EDTA-Fe ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.249, EDTA 0.261, KOH 0.157)。培养液ppH6.5。

无藻满江红的制备 取以上述经表面灭菌并洗净的萍体, 将按上法剥离的茎尖分生组织逐个分别接入装有Nickell培养液的三角瓶中培养。Nickell培养液的配方是(mg/L): KNO_3 202; KCl 150; KH_2PO_4 136; $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 708; CaCl_2 167; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 246; MgCl_2 96; H_3BO_3 0.1; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1; $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.3; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1; EDTA- Na_2 370; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 280。培养液pH 6.5。

以上操作均在本研究所组培实验室的无菌环境下(苏净SW-CJ-2F型)完成。培养条件为: 26℃/18℃(日/夜), 光强550 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。10—15d更新培养液。待繁殖足量后分别称取样品用于下一步的实验。

1.2 扫描电镜样品制备与观察

选取上述满江红植株的营养体, 在解剖镜下细心去除根系后, 将剥离的萍体用2.5%戊二醛溶液(0.1 mol/L磷酸缓冲液, pH7.4)在室温下固定4h, 用同样的磷酸缓冲液洗涤3次后, 用2%锇酸在4℃下固定2h, 又经磷酸缓冲液充分洗涤后, 用乙醇逐级脱水, 并经环氧丙烷替换两次。试样用HCP-2型临界点干燥器干燥, 将经干燥的样品黏附于铜台上, 在高倍解剖镜下用细针解剖, 使满江红叶腔内的微生物群落充分暴露, 再用IB-5型离子溅射仪喷镀铂钯, 用JEOL JSM-6380lv型扫描电子显微镜观察并拍片, 加速电压15 KV。

1.3 满江红DNA提取与16S rRNA基因和nif基因的PCR扩增

采用DNA提取试剂盒(上海生工)和说明书的操作步骤提取样本的DNA, 用0.7%琼脂糖凝胶电泳对检测所提取DNA的完整性。

以提取的满江红基因组DNA为模板, 在ABI GeneAmp[®] 9700型反应仪上进行PCR反应。细菌16S rDNA引物为: 338F(5'-ACTCCTACGGGAG GCAGCAG-3'), 806R(5'-GGACTACHVGGGT WTCTAAT-3'), 反应体系20 μ L, 包含: 4 μ L的5 $\times$ FastPfu Buffer; 2 μ L的2.5 mmol/L dNTPs; 各0.8 μ L的正向扩增引物(5 μ mol/L)及反向扩增引物(5 μ mol/L); 0.4 mL TransStartFastPfu聚合酶; 0.2 μ L BSA; 10 ng 模板 DNA; 补ddH₂O至20 μ L。PCR反应参数为: 95 $^{\circ}$ C预变性3min, 27循环(95 $^{\circ}$ C变性30s, 55 $^{\circ}$ C退火45s, 72 $^{\circ}$ C延伸1.5min); 72 $^{\circ}$ C延伸 10min。

*nif*基因的扩增引物为*nif*H-F(5'-AAAGGYGG WATCGGYAARTCCACCAC-3'), *nif*H-R(5'-TT GTTSGCSGCRTACATSGCCATCAT-3')。PCR反应参数为: 95 $^{\circ}$ C预变性3min, 35循环(95 $^{\circ}$ C变性20s, 55 $^{\circ}$ C退火45s, 72 $^{\circ}$ C延伸1min), 72 $^{\circ}$ C延伸10min。

PCR产物经1.8%琼脂糖凝胶电泳检测后, 委托上海美吉生物科技有限公司用Illumina的MiSeq测序仪对rRNA基因的扩增序列进行高通量测序。

1.4 数据处理与生物信息学分析

用Flash软件对MiSeq测序得到的PE reads根据overlap关系进行拼接, Trimmomatic软件对拼接序列质量进行质控和过滤, 获得高质量的Tags序列。在Usearch(vsesion 7.0)平台, 按照97%相似性对非重复序列(不含单序列)进行操作分类单元(Operation taxonomic unit, OTU)聚类, 在聚类过程中去除嵌合体, 得到OTU的代表序列。为了得到每个OTU对应的物种分类信息, 基于silva数据库, 采用RDP classifier贝叶斯算法对97%相似水平的OTU代表序列进行分类学分析, 并分别在从域(Domain)到种(Species)各个分类学水平统计各样本的群落组成。分析在美吉生物科技有限公司的生物云平台(i-sanger)上完成。

2 结果

2.1 表面无菌的含藻满江红与无藻满江红的获得与验证

得到植株表面无外源微生物污染, 但叶腔仍含有共生蓝藻(下称symbiont或cyanobiont)为优势种的内生细菌群落的满江红样本是进行本研究的前提。参照白克智^[29]的方法, 经过近2个月的茎尖组织培养, 取得了在IRRI无氮培养液正常生长的小叶满江红群体, 成功率为10%。验证方法有三: (1)培养60d后, 培养液洁净通透, 未见污染; (2)用扫描电镜随机检查10株萍体及其根系, 萍体叶片, 尤其是根毛间隙未见到任何细菌(图1), 而叶腔中以共生

蓝细菌为主的内生细菌群落与自然界的满江红叶腔菌落无异(图3)而在自然条件下生长的满江红, 可见细菌附着于植株, 尤其是根表皮细胞(图1)。通过茎尖组织培养也取得了在Nickell富氮培养液健康生长的萍体。成功率为5%。验证方法同上。即培养60d后, 结合态氮丰富的Nickell培养液依然澄清洁净, 叶片和根表未见微生物存在, 且叶腔内未见*Nostoc azollae*存在的迹象(参见2.2); (3)用*nif*H-PCR和测序检测(详见2.3和2.4)。电镜观察和*nif*H-PCR检测结果均表明本研究采用的方法是成功的。本文将表面无菌、叶腔中含有以*Nostoc azollae*为优势的微生物群落、*nif*H-PCR检测阳性的满江红, 简称为含藻满江红(*Azolla* with symbiont), 叶腔中未见共生藻且测序检测无*Nostoc azollae*者即称为无藻满江红(symbiont-free *Azolla*)。

氮素对满江红表现形态的建成有明显的影 响。如图2所示, 在无氮条件下生长满江红样品

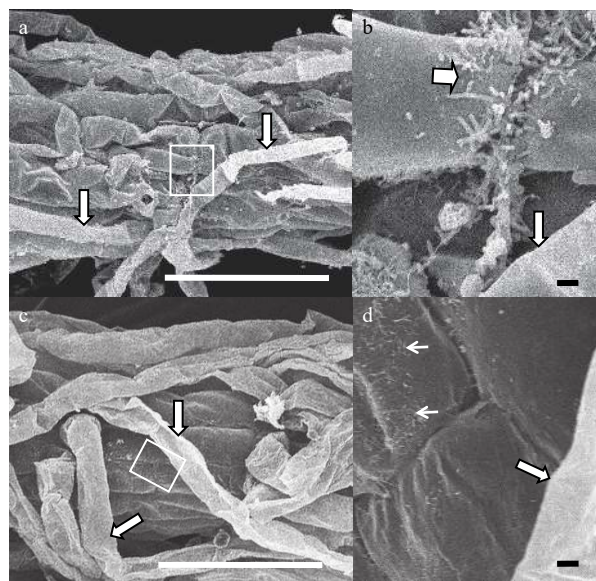


图1 满江红根部表面的扫描电镜照片

Fig. 1 Images of the root surface of *Azolla* by SEM

上图为自然条件下生长的满江红根部, 图b为图a方框的放大图。长白箭头示根毛细胞, 图b短箭头示根表的杆状细菌。图c为经茎尖组织培养的满江红根部。图d为图c方框的放大图。长白箭头示根毛细胞, 细小箭头示根细胞间隙的分泌物。图中白色标尺=100 μ m

Upper part is a portion of the root surface of *Azolla* growing under natural conditions. a is a magnification of the box on the left of the upper picture (b). The long white arrow shows root hair cells, and the short arrow points to rod-shaped bacteria on the root surface. The lower part of the picture (c, d) shows the root of the *Azolla* frond generated by shoot tip tissue culture. The right one (d) is a magnified view of the box of the left one (c). Long white arrows indicate root hair cells, and small arrows illustrate secretions at the inter space of root cells. Scale bar=100 μ m

(AmA)的萍体大小和叶片间距分别比无藻满江红(AmB)大约20%和15%。而后者背叶裂片上的乳头状突起(papillae)明显凸起,前者却略显扁平。用扫描电镜对叶腔的观察表明:添加结合态氮并不影响满江红叶腔和腺毛的发生,但对其中存在的共生蓝藻*Nostoc azollae*却发生了可鉴别的变化,即在自然及无氮生长条件下明显可见的共生蓝藻全部消失。

2.2 含藻满江红与无藻满江红叶腔微生物群落的形态结构比较

利用扫描电镜对含藻满江红与无藻满江红叶腔中微生物群落的形态做进一步观察(图3—6),可以看到两者有如下差别:(1)含藻满江红叶腔中以*Nostoc azollae*为优势的内生菌占据了大部分的可用空间。由异形胞(小五星标志)和营养细胞组成的蓝藻丝状体缠绕于叶腔约15个单支腺毛细胞之间,并彼此连接成网络状结构;在其幼叶(叶龄为第2到第5叶),叶腔内的细菌大多附着于蓝藻细胞上,或彼此聚集成类似生物被膜(biofilm)的构造,厚度约1 μm 。众多的蓝藻和细菌细胞包埋在由多种分泌物构成的基质中(大星形标志,图4)。在成熟的叶腔(叶龄一般是在第6—7叶以上,此时叶腔开口完全封闭)蓝藻和细菌等微生物与叶腔内的腺毛紧密结合,形成一个大小与叶腔相适配的椭球形藻囊(Algal pocket),外由一层约50 nm的薄膜包裹(图6)。打开藻囊,可见腺毛和藻、菌等相互交织,形成多层次、多种结构的生物被膜,厚度可达2—5 μm (另文报道);(2)无藻满江红的从幼叶到老叶,除了环绕在叶腔周围的腺毛外,均未见*Nostoc azollae*。在低倍放大的电镜视野中,叶腔基本是中空的(图3)。在高倍放大的电镜视野中,可以看到形态各异的细菌附着于无藻满江红叶腔的腺毛细胞表面或分散在叶腔内壁上,但未见生物被膜存在,更没有形成

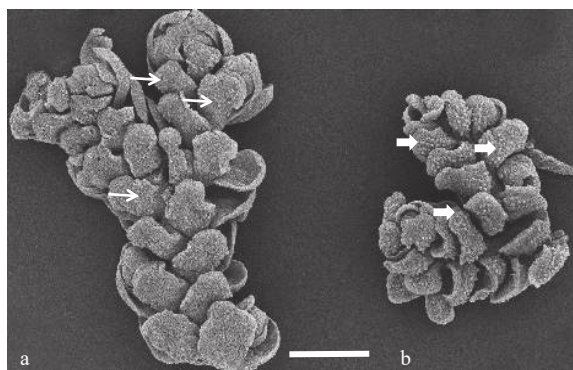


图2 含藻满江红(a)与无藻满江红(b)的表观形态(扫描电镜照片,标尺=1 mm)

Fig. 2 The morphological appearance of *Azolla* with the symbiont (a) and symbiont-free *Azolla* (b) by SEM (Scale bar=1 mm)

藻囊结构(图5)。

2.3 内生微生物的16S rRNA和nifH基因的PCR扩增

应用基因组试剂盒对含藻和无藻满江红提取总DNA,分别以细菌的16S rRNA基因和*nifH*基因的区段设计引物,以提取的DNA为模板进行PCR扩增。扩增结果由图7可见:泳道1—4均在500 bp附近扩增出单一的DNA条带,表明在满江红的培养基中无论是否添加氮素,其内生的细菌群落均具有16S rRNA基因和*nifH*基因区域的特异性扩增。

2.4 满江红内生细菌16S rRNA基因和nifH基因扩增产物样本的测序数据

对分别在无氮和富氮两种培养模式下的满江红样本不同细菌群落的PCR扩增产物进行高通量的测序分析,将得到的代表16S rRNA基因和*nifH*基因区段的样本测序数据总结在表1中。

由表1可见:通过对细菌16S rRNA基因的可变

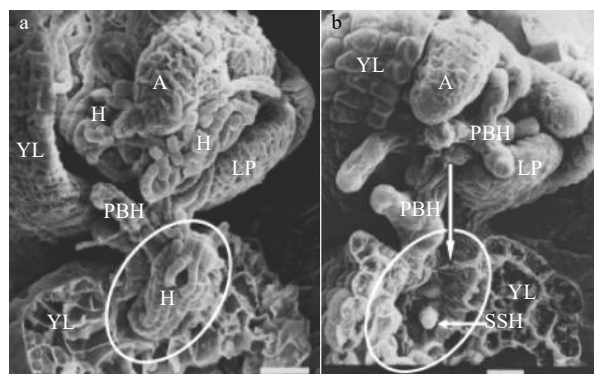


图3 扫描电镜照片显示结合态氮对满江红茎尖区域共生藻的抑制效应

Fig. 3 The inhibitory effect of combined nitrogen on the symbionts at the apical region of *Azolla* frond analyzed by SEM

图a为含藻满江红的茎尖区域剖面,可见附着于茎尖(A, apex)附近的初分支腺毛(PBH, primary branched hair)的蓝藻为缺乏异形胞却又活跃分裂的营养细胞(又称藻殖段,即Homogonia, H)正进入幼叶腔(YL, young leaf)。图b为无藻满江红的茎尖区域剖面,未见共生蓝藻,但可见发生于茎尖的初生分支腺毛与幼叶的分支腺毛相互交织搭桥,引导蓝藻细胞向幼叶腔(图中椭圆形区域)运动(箭头)。图b叶腔中的SSH(secondary simple hair)为正在发育的次生单支腺毛。茎尖区域的叶原基用LP(leaf primodium)标示。标尺=20 μm

a shows a profile of the apical region of *Azolla* with the symbionts. The cyanobacteria attached to the primary branched hairs (PBH) near the apex are vegetative cells (also known as Homogonia, H) lacking heterocysts but actively dividing and moving into the young leaf cavity (YL). b is the apical profile of the *Azolla* without the symbiont, showing the PBH occurring at the apex interlaced with the PBH within young leaf, and leading the cyanobacterial cells gliding into the young leaf cavity (elliptic region in the picture) (arrow). The developing secondary simple hair in the leaf cavity on the right picture was marked as SSH. Leaf primordia at apex region were labeled with LP. Scale bar=20 μm

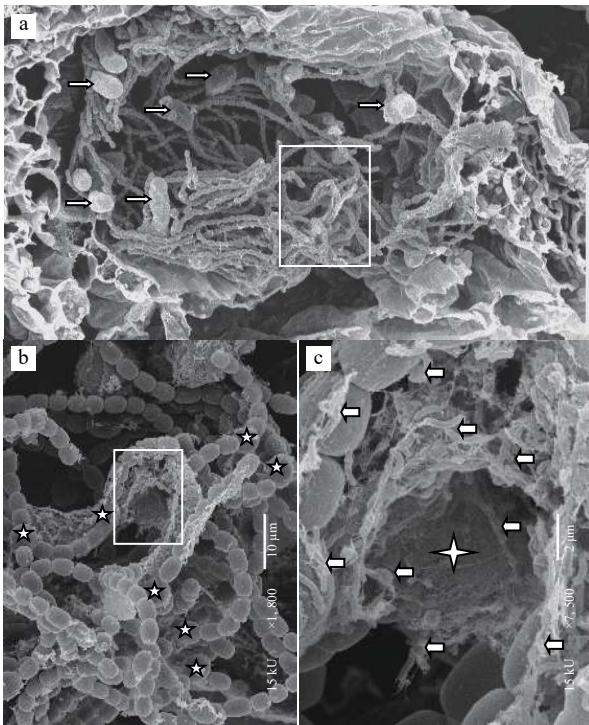


图4 含藻满江红叶腔剖面的扫描电镜照片

Fig. 4 The profile of the fourth leaf cavity within the *Azolla* with symbiotic cyanobacteria by SEM

图a为第四叶腔的横剖面,显示共生蓝藻的丝状体大多缠绕在叶腔腺毛(细白箭头)。图b为上图方框的放大照片。小五角星示共生蓝藻的异形胞。图c为b图方框的放大照片。粗箭头示内生细菌附着于蓝藻细胞表面或与分泌物交织聚集成生物被膜结构。四角星号标示生物被膜的基质结构。标尺见各图右侧。上图标尺=100 μm

a indicates that the symbiotic cyanobacterial are mostly entangled in the hair cells (white and thin arrows). b is a magnified image of the box in the upper one (a). The small stars mark the heterocysts of the symbiont. The lower right photo (c) is a magnified photo of the box in the left one (b). The thick arrows indicate that endophytic bacteria adhere to the surface of cyanobacterial cells or integrated with the secretions, forming the biofilm. Asterisks indicate the matrix structure of the biofilm. The bar appears on the right side of each picture. All scale bars above=100 μm

区和固氮菌*nifH*基因区段的扩增产物进行高通量测序,对读取的序列PE reads进行拼接,质控和过滤后,获得标签Tags序列。从生长于无氮培养基的满江红样品(AmA)以及生长于富氮培养基的满江红样品(AmB)所得到的标签序列的数量,碱基数,序列的平均长度及长度范围比较而言,两者间差异并不大,即使有所差异也无实际意义。但在Usearch (vsesion 7.0)平台,按照97%相似性对非重复序列(不含单序列)进行操作分类单元(Operation taxonomic unit, OTU)聚类后,可以看出,在富含结合态氮的Nickell培养基中生长的满江红(AmB),其基于≥97%的相似度水平,通过聚类分析共获得的有

效OTUs的数目大幅度的减少,其中以16S rRNA基因为标记的OTU减少了53%;以*nifH*基因标记的OTU减少了64%。由于IRRI培养基和Nickell培养基除氮素外,其余培养成分基本相同。测序结果表明:结合态氮对满江红内生细菌无论是总菌群和固氮菌群的多样性的减少起到了关键的作用。

2.5 含藻满江红与无藻满江红的细菌群落组成

为了得到每个OTU对应的细菌物种的分类信息,基于silva数据库,采用RDP classifier贝叶斯算法对97%相似水平的OTU代表序列进行分类学分析,分别在各个分类学水平:Domain(域)、Kingdom(界)、Phylum(门)、Class(纲)、Order(目)、Family(科)、Genus(属)、Species(种)统计出各样本的群落组成,

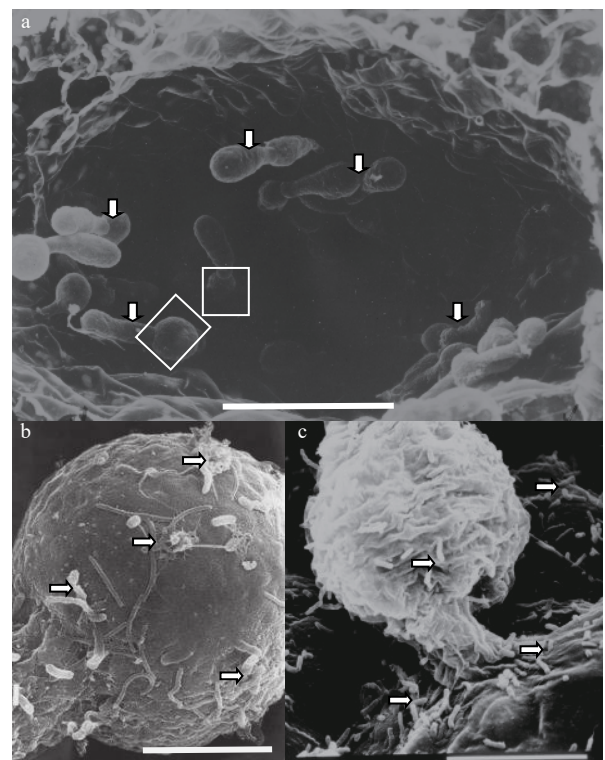


图5 无藻满江红第四叶腔横剖面的扫描电镜照片

Fig. 5 The cross profile of the fourth leaf cavity of the cyanobiont-free *Azolla* by SEM

图a可见叶腔内的腺毛细胞(箭头),但无共生蓝藻。图b为图a左侧方框的放大图,可见形态各异的细菌(箭头)附着于腺毛基细胞表面。图c为图a右方框的放大图,可见内生细菌(箭头)分散于腺毛基细胞核叶腔内壁表面。图a标尺=50 μm,图b和图c标尺=10 μm

a shows the hair cells (arrows) occupying the leaf cavity and no cyanobacteria could be seen. b is the enlarged view of the left box in the upper photo (a) indicating bacteria (arrows) with various shapes attached to the surface of the basal cells of the hair. c is a magnified one of the right box in the upper photo (a), illustrating endophytic bacteria (arrows) scattered on the inner surface of the leaf cavity. The scale bar in a=50 μm, in b and c=10 μm

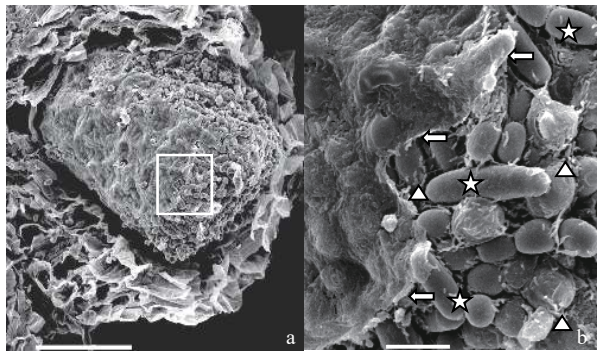


图 6 含藻满江红第七叶叶腔剖面扫描电镜照片

Fig. 6 The profile of the seventh leaf cavity within *Azolla* with the symbiont by SEM

左图叶腔中的椭圆体即由满江红腺毛、共生藻和内生菌及其分泌物形成的藻囊,其表面被一层囊膜包裹。标尺=200 μm。图b为图a方框放大图,箭头指向左侧囊膜断面,右侧可见蓝藻细胞(短粗箭头),细菌(黑细箭头)和腺毛基细胞断面(五星形)。标尺=10 μm

a shows that the leaf cavity is mostly occupied by an algal pocket (ellipsoid-like structure) that was formed by the hair cells, symbiotic cyanobacteria, endophytic bacteria and their secretions, and the surface of the pocket is enveloped by a layer of membrane. Scale bar=200 μm. b is an enlarged image of the box in the left one (a) with arrows pointing to the ruptured zone of the membrane. The cyanobacteria (pentacle) and the bacteria (triangle) covered by the membrane are visible clearly. Scale bar=10 μm



图 7 满江红内生细菌的PCR扩增产物的电泳图谱

Fig. 7 PCR products amplified from endophytic bacteria of *Azolla*

DL2000. DNA分子量标准; 1. 含藻满江红16S rRNA基因; 2. 含藻满江红nifH基因; 3. 无藻满江红nifH基因; 4. 无藻满江红16SrRNA基因; CK. 空白对照

DL2000. DNA molecular maker; 1. PCR products of 16S rRNA gene amplified from *Azolla* with symbiont; 2. PCR products of *nifH* gene amplified from *Azolla* with symbiont; 3. PCR products of *nifH* gene amplified from symbiont-free *Azolla*; 4. PCR products of 16S rRNA gene amplified from symbiont-free *Azolla*; CK: Control

在各个分类水平上进行群落结构的分析。

对16S rRNA基因标记的全细菌群落的结构分析表明(图 8): 生长在无氮和富氮两种培养条件下的满江红叶腔中细菌群落的组成差异很大。在无

表 1 不同满江红样本的两种细菌基因扩增区段的测序数据统计
Tab. 1 The summarized sequencing data of amplified fragments of two bacteria genes from different *Azolla* samples

基因 Gene	测序信息 Sequencing information	AmA IRRI无氮培养 基中满江红样品 <i>Azolla</i> sample growing in IRRI nitrogen-free medium	AmB Nickell富氮培养 基中满江红样品 <i>Azolla</i> sample growing in Nickell nitrogen- abundant medium
16S rRNA	序列数 Seq. No.	32923	40112
	碱基数 Basic No.	14305020	17250702
	序列平均长 度Seq. average length	434.5	430.06
	长度范围 The range of length	421–453	283–474
	可分类操作 单元数 OTUs	17	8
<i>nifH</i>	序列数 Seq. No.	36959	38869
	碱基数 Basic No.	15973812	16898104
	序列平均长 度Seq. average length	432.20	434.74
	长度范围 The range of length	246–534	265–528
	可分类操作 单元数 OTUs	14	5

氮条件下生长的满江红(AmA)中检出17个OTU, 分属于4门: 蓝藻门Cyanobacteria(52.5%)、变形菌门Proteobacteria(47.4%)、硬壁菌门Firmicutes(0.059%)和拟杆菌门Bacteroidetes(0.0016%)。有2个OTU分别属于蓝细菌菌门Cyanobacteria的蓝细菌目(10.44%)和未命名的Subsection IV目; 有11个分别属于变形菌门中的草螺菌属*Herbospirillum*(28.54%)、*Niveispirillum*菌属(6.78%)和根瘤菌属*Rhizobium*(4.42%); 以及乳酸杆菌属*Lacibacterium*、鞘脂单胞菌属*Sphingomonas*、大肠杆菌志贺菌属*Escherichia-Shigella*、嗜甲烷菌属*Methylophilus*、红螺菌属*Rhodospirillales*和假单胞菌属*Pseudomonas*; 有3个属于厚壁菌门Firmicutes的小杆菌属*Dialister*(嗜血杆菌族)、链球菌属*Streptococcus*和粪便杆菌*Faecalibacterium*。还有1个属于拟杆菌Bacteroidetes中*Bacteroides*属。而添加氮营养明显降低了满江红内生细菌的多样性。其内生细菌种类明显减少, 为8个OUTs, 分属于4门。即蓝藻门Cyanobacteria(86.79%), 均属于蓝藻目Cyanobacteria, 其余为变形菌门(13.12%)、放线菌门(0.061%)和厚壁菌门(0.038%)。与AmA相比, 属于未命名Section IV目的蓝细菌消失了。此

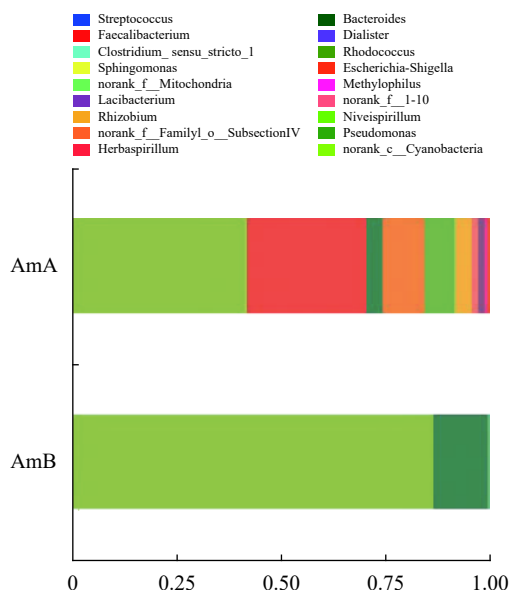


图 8 两种满江红样品 16S rRNA 基因的内生细菌在属水平的群落丰度的百分比

Fig. 8 Percent of community abundance of the endophytic bacteria in two *Azolla* samples based on 16S rRNA gene at genus level

AmA. 在无氮的IRRI培养基中生长的满江红样品 *Azolla* sample cultured in nitrogen-free IRRI medium

AmB. 在含结合态氮的Nickell培养基生长的满江红样品 *Azolla* sample cultured in combined nitrogen-containing Nickell medium

外, 添加结合态氮也降低了变形菌门细菌的多样性, 其中具有固氮能力的草螺菌(*Herbaspirillum*)、*Niveispirillum*和根瘤菌(*Rhizobium*)等属的细菌基本消失, 而假单胞菌(*Pseudomonas*)属的成员成了优势菌(12.9%)。前三者菌在AmA中分别占有28.6%、6.7%和4.4%; 后者仅占3.67%。

2.6 *nifH* 基因鉴别的内生菌群落组成

16S rRNA 基因扩增产物的测序结果表明, 在富氮培养基生长的无藻满江红样品(AmB)中仍检出了蓝细菌, 且占优势。这些蓝细菌是否固氮的 *Nostoc azollae*? 本研究对固氮酶基因 *nifH* 的检测给出了答案。

测序结果表明, 从含藻满江红样品(AmA)中得到36959条序列, 而无藻满江红(AmB)也得到38869条序列。但两者间的微生物的可操作分类单元(OTU)明显不同, 前者 *nifH* 测序序列形成14个细菌的OTU, 满江红共生体的 *nifH* 基因主要来自蓝藻门, 变形菌门和未知细菌的门类。其中蓝藻门的 *nifH* 基因的细菌群落占了88.44%的优势, 划分到种属水平均为满江红的共生蓝藻 *Nostoc azollae*, 变形菌门中含有 *nifH* 基因的细菌群落占了11.32%, 包括固氮的草螺菌(*Herbaspirillum*)、*Niveispirillum*和根瘤菌(*Rhizobium*)。在门水平无法认定的固氮菌为

0.23%。后者仅有5个OTUs, 来自变形菌门(99.71%)和未知门类的细菌(0.29%), *Pseudomonas stutzeri* 占99.54%, 还有0.16%含有 *nifH* 基因的细菌落无法认定到纲的水平。值得注意的是蓝藻门的 *nifH* 基因未检出。这就是说从无藻满江红(AmB)16S rRNA 基因扩增产物检出的蓝藻并不是固氮的 *Nostoc azollae*(图 9)。

3 讨论

3.1 结合态氮对 *Nostoc azollae* 的抑制效应

自从白克智等^[29]开发出茎尖培养技术以来, 经本实验室略加改进后一直用此法获得无藻满江红。比较IRRI和Nickell培养液的化学组成, 两者的主要差别在后者含有较多的结合态氮[KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$], 表现出对共生蓝藻的显著抑制作用。为此我们通过剥离包裹共生蓝藻的幼叶, 让 *Nostoc azollae* 与 NO_3^- 和 Cu^{2+} 充分接触。据我们观察, 附着于茎尖的蓝藻藻殖段(Homogonia)并不含异形胞(图 3), 且生命力强。如不将之充分暴露于 NO_3^- , 它们可能存活下来。Li Fay-Wei等^[8]报道, 在培养液中添加 NH_4NO_3 可使满江红体内的共生蓝藻消失, 以致无法用PCR检出 *nifH*。我们曾做了同样的尝试, 但经过连续的继代培养后其共生蓝藻又“复活”了。而在Nickell培养液生长的无藻满江红投入无氮的IRRI培养液则难以存活。这说明在结合态氮的“压力”下, 满江红叶腔中绝大部分的蓝藻消失了,

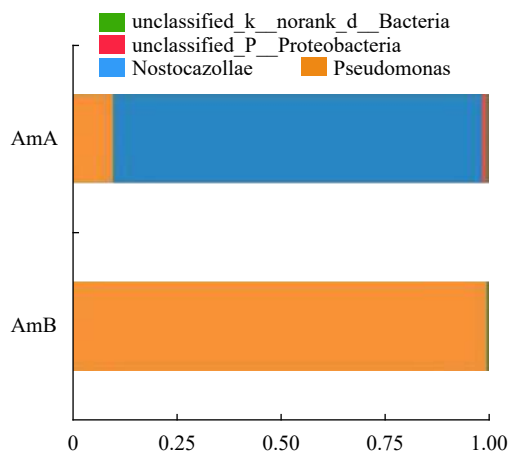


图 9 两种满江红样品含 *nifH* 基因细菌在属水平的群落丰度的百分比

Fig. 9 Percent of community abundance of the endophytic bacteria in two *Azolla* samples based on *nifH* gene at genus level

AmA. 在无氮的IRRI培养基中生长的满江红样品 *Azolla* sample cultured in nitrogen-free IRRI medium; AmB. 在含结合态氮的Nickell培养基生长的满江红样品 *Azolla* sample cultured in combined nitrogen-containing Nickell medium

但仍有极少数的蓝藻细胞存活下来。

值得指出的是,在无藻满江红体内尽管未检出固氮的*Nostoc azollae*,但仍有相当数量其他不固氮的蓝藻存在。这一结果颠覆了长期以来的人们关于满江红的内生藻就是*Nostoc azollae*的认知。我们曾用荧光显微镜和电镜观察到叶腔中无异形胞的蓝藻(另文报道)。所以严格说来,所谓含“藻”满江红和无“藻”满江红严格地说应是含*Nostoc azollae*和不含*Nostoc azollae*的满江红。而以往文献中常用的*Azolla-Anabaena symbiosis*或*Azolla-Nostoc symbiosis*的提法也值得推敲。

3.2 结合态氮对满江红叶腔中微生物群落组成的影响

本研究用Illumina MiSeq高通量测序平台对细菌的rRNA基因的可变区进行了序列测定。这在很大程度上提高了对细菌群落组成进行定性与定量的精确度。通过序列的算法分析,在聚类过程中去除嵌合体,可以比较准确地得到OTU的代表序列,从而比较精确地确定其对应的物种信息,还可以依据测序序列read的数量,统计它们的相对丰度。

本研究结果再次证明,在无氮条件下生长的小叶满江红(*A. microphylla*)含有数量和种类众多的以蓝细菌占优势的内生细菌。用高通量测序技术检出了横跨四个门类的细菌,仅变形菌门就有11个属,还有大量不可培养的细菌种类,目前为止从满江红中检出细菌的门类最多。本实验室郑斯平等^[28]用T-RFLP技术和PAT软件,分析结果表明从小叶满江红中有41个属的细菌,但大部分属于变形菌门。Laerua等^[30]用宏基因组测序技术和相关软件分析,从蕨状满江红(*A. filiculoides*)也检出以*Nostoc azollae*为优势(60%—75%),包括变形菌门、拟杆菌门和放线菌门的内生细菌。这两种满江红内生菌的主要类群相似。

值得注意的是,我们在含藻满江红叶腔中除了固氮的*Nostoc azollae*外,也检出了固氮草螺菌(*Herbasprillum*)、*Niveispirillum*和根瘤菌(*Rhizobium*)等固氮细菌。Laerua等^[30]也报道了包括蕨状满江红和小叶满江红在内的地球上现存的7种满江红叶腔中均有根瘤菌(*Rhizobium*)存在,但没有说明是否有其他固氮细菌或蓝细菌被检出。至于在用Nickell培养液培养的萍体样品中*nifH*基因来自*Pseudomonas stutzeri*,其潜在作用有待进一步研究。

如上所述,无藻满江红均未检出固氮的*Nostoc azollae*以及固氮草螺菌(*Herbasprillum*)、*Niveispirillum*和根瘤菌(*Rhizobium*)等固氮细菌。由于缺乏这些原先可以提供结合态氮的微生物,势必颠覆无

藻满江红及内生细菌的氮代谢通路,从而从根本上改变内生细菌的群落构成。由于内源氮素基本被切断,其内生菌种类和数量的变化在所难免。

3.3 结合态氮对满江红表型结构的影响

从形态学的角度来看,结合态氮导致共生藻*Nostoc azollae*从满江红叶腔内消失,进而使与*Nostoc azollae*共生的内生菌数量种类明显减少,未能形成生物被膜和藻囊。生物被膜(Biofilm)是多种微生物聚集并包埋在自身分泌的胞外高分子基质(Extracellular polymeric substances, EPS)中的一种构造,其性质完全不同于自由散在的微生物细胞群体^[31]。本研究揭示的满江红叶腔中的生物被膜可能比一般所称的生物被膜更为复杂。因为除了蓝藻、细菌等微生物外,它还包含真核宿主的腺毛细胞及其分泌物。这种生物被膜的形成和发生不仅有利于微生物自身的生长繁衍和物质、信息交换,也势必对宿主满江红的生长发育乃至抗逆等方面都会有正面的促进作用。藻囊是迄今为止植物共生固氮体系中最特殊的共生结构。它作为腺毛、蓝藻、细菌等多种微生物相互交织、互利互惠、可实现囊内物质循环的相对独立的实体结构,又通过腺毛与宿主进行物质和信息交换,形成错综复杂的交互网络。这是无藻满江红无可比拟的。所以含藻满江红个体比无藻满江红大且肥厚就不足为奇了。

总的来说,结合态氮把*Azolla-Nostoc azollae*共生固氮体系还原为“纯粹”的蕨体。原先互惠互利的碳氮代谢通路已不复存在。无藻满江红需要依赖外源结合态氮才能存活。从表观上看,无藻满江红个体变小了,叶片因为缺少藻囊而变得更“紧凑”了,甚至连叶表的乳头状突起也有某种程度的“修饰”。这启示我们:通过改变植物的共生伙伴和内生菌群落结构有可能改变植物的表型和生存方式。深入探讨和比较含藻满江红与无藻满江红的生长速度、营养品质及其影响因子的分子机制,有望为作物增产和品质改良提供新的线索和思路。

参考文献:

- [1] Lumpkin T A, Plucknett D L. *Azolla*: Botany, physiology, and use as a green manure [J]. *Economic Botany*, 1980(34): 111-153.
- [2] Liu Z Z, Zheng W W. *Azolla* in China [M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 1989: 279-802. [刘中柱, 郑伟文. 中国满江红 [M]. 北京: 农业出版社, 1989: 279-802.]
- [3] Becking J H. Endophyte transmission and activity in the *Anabaena-Azolla* association [J]. *Plant and Soil*, 1987(100): 183-212.
- [4] Peters G A, Meeks J C. The *Azolla-Anabaena* symbiosis:

- Basic biology [J]. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1989(40): 193-210.
- [5] Ito O, Watanabe T. The relationship between combined nitrogen uptaken and nitrogen fixation in *Azolla-Anabaena* symbioses [J]. *New Phytologist*, 1983(95): 647-654.
- [6] Singh S, Hasija S K, Negi S. *et al.* Mutational analysis of the NH_4^+ -nitrogen controls that regulate ammonium transport activity, heterocyst differentiation, nitrogenase activity and the heterocyst-spacing pattern in the cyanobacterium *Nostocmuscorum* [J]. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1994, **32**(2): 359-370.
- [7] Paul B, Henriette S, Klaas G J N, *et al.* Growing *Azolla* to produce sustainable protein feed: the effect of differing species and CO_2 concentrations on biomass productivity and chemical composition [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, **98**(12): 4759-4768.
- [8] Li F W, Brouwer P, Carretero-Paulet L, *et al.* Fern genomes elucidate land plant evolution and cyanobacterial symbioses [J]. *Nature Plants*, 2018(4): 460-472.
- [9] Duckett J G, Toth R, Soni L. An ultrastructural study of the *Azolla-Anabaena* relationship [J]. *New Phytologist*, 1975(75): 111-118.
- [10] Calvert H E, Peters G A. The *Azolla-Anabaena azollae* relationship IX. Morphological analysis of leaf cavity hair population [J]. *New Phytologist*, 1981(89): 327-335.
- [11] Zheng W W, Lin Y H, Liu Z Z, *et al.* The ultrastructure of the hair cell in *Azolla* [J]. *Journal of Fujian Academy of Agricultural Sciences*, 1987, **2**(1): 13-16. [郑伟文, 林亦瀚, 刘中柱, 等. 满江红腺毛细胞的超微结构 [J]. 福建省农科院学报, 1987, **2**(1): 13-16.]
- [12] Zheng W W, Lin Y H, Lin Y H, *et al.* Electron microscopic observation of symbiotic relationship between *Azolla* and *Anabaena* during the megaspore germination and the sporeling development of *Azolla* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1990, **32**(7): 514-520. [郑伟文, 林永辉, 林亦瀚, 等. 满江红大孢子果萌发与成苗期间蕨-藻共生关系的电镜观察 [J]. 植物学报, 1990, **32**(7): 514-520.]
- [13] Zheng W W, Rang L, Bergman B. Structural Characteristics of the Cyanobacterium-*Azolla* Symbioses [M]//Pawlowski K (Eds.), Springer: Prokaryotic Symbionts in Plants, 2009: 235-263.
- [14] Zheng W W, Bergman B, Chen B, *et al.* Cellular responses in the cyanobacterial symbiont during its vertical transfer between plant generations in the *Azolla microphylla* symbiosis [J]. *New Phytologist*, 2009(181): 53-61.
- [15] Ran L, Larsson J, Vigil-Stenman T, *et al.* Genome erosion in a nitrogen-fixing vertically transmitted endosymbiotic multicellular cyanobacterium [J]. *PLoS One*, 2010(5): e11486.
- [16] Ariana N, Eily K M, Li F W. A first glimpse at genes important to the *Azolla-Nostoc* symbiosis [J]. *Symbiosis*, 2019(78): 149-162.
- [17] Gates J E, Fisher R W, Candle R A. The occurrence of corynoform bacteria in the leaf cavity of *Azolla* [J]. *Archive Microbiology*, 1980(127): 163-165.
- [18] Forni C, Gentili S, van Hove C, *et al.* Isolation and characterization of the bacteria living in the sporocarps of *Azolla filiculoides* Lam [J]. *Annals Microbiology*, 1990(40): 235-243.
- [19] Forni C, Gaegi A, Del Gallo M. Polysaccharide composition of the mucilage of *Azolla* algal packet [J]. *Symbiosis*, 1998(24): 303-313.
- [20] Nierzwicki-Bauer S A, Aulfinger H. Ultrastructural characterization of eubacteria residing within leaf cavities of symbiotic and cyanobiont-free *Azolla Mexicana* [J]. *Current Microbiology*, 1990(21): 123-129.
- [21] Nierzwicki-Bauer S A, Aulfinger H. Occurrence and ultrastructural characterization of bacteria in association with *Azolla* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991(57): 3629-3636.
- [22] Plazinski J, Taylor R, Shaw W, *et al.* Isolation of *Agrobacterium* sp. strain from the *Azolla* leaf cavity [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1990(70): 55-59.
- [23] Zheng W W, Lu P J, Lin Y H, *et al.* Electron microscopic observation of endo-bacteria within *Azolla* [J]. *Agricultural Science and Technology of Fujian*, 1986(4): 7-12. [郑伟文, 陆培基, 林亦瀚, 等. 红萍体内伴生细菌的电镜观察 [J]. 福建农业科技, 1986(4): 7-12.]
- [24] Zheng W W. Occurrence of bacteria in *Azolla-Anabaena* association and their interaction [J]. *Journal of Electron Microscopy China*, 1991(15): 54-56.
- [25] Serrano R, Carrapico F, Vidal R. The presence of lectins in bacteria associated with *Azolla-Anabaena* symbiosis [J]. *Symbiosis*, 1999(15): 169-178.
- [26] Lechno Y S, Nierzwicki-Bauer S A, Rai A N, *et al.* Cyanobacteria in Symbiosis [M]. Dordrecht. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002: 153-178.
- [27] Zheng S P, Chen B, Guan X, *et al.* Diversity analysis of endophytic bacteria within *Azollamicrophylla* using PCR-DGGE and electron microscopy [J]. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 2008, **5**(3): 269-276.
- [28] Zheng S P, Chen B, Wang J, *et al.* T-RFLP Analysis on diversity of endophytic bacteria in *Azolla microphylla* [J]. *Journal of Anhui Agriculture Sciences*, 2012, **40**(29): 14185-14187, 14270. [郑斯平, 陈彬, 王瑾, 等. 小叶满江红(*Azolla microphylla*)内生细菌多样性的T-RFLP分析 [J]. 安徽农业科学, 2012, **40**(29): 14185-14187, 14270.]
- [29] Bai K Z, Yu S L, Chen W L, *et al.* Isolation and pure culture of algae-free *Azolla* and *Anabaena azollae* [J]. *Chinese Sciences Bulletin*, 1979(14): 664-666. [白克智, 于赛玲, 陈维纶, 等. 无藻满江红和满江红鱼腥藻的分离与培养 [J]. 科学通报, 1979(14): 664-666.]
- [30] Laura W D, Paul B, Henk B, *et al.* Is there foul play in the leaf pocket? The metagenome of floating fern *Azolla* reveals endophytes that do not fix N_2 but may denitrify [J].

New Phytologist, 2018(217): 453-466.

[31] Hans-Curt F, Ulrich S. Biofilms an emergent form of bac-

terial life [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016(14): 563-575.

THE EFFECTS OF COMBINED NITROGEN ON THE MICROBIAL COMMUNITY COMPOSITION AND STRUCTURES WITHIN *AZOLLA MICROPHYLLA*

CHEN Jian, CHEN Bin, ZHENG Si-Ping, ZHENG Yi-Ping, ZHU Bing-Yao and ZHENG Wei-Wen

(Biotech Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract: The aquatic fern *Azolla* is symbiotically associated with N_2 -fixing cyanobacterium, *Nostoc azollae*, which resides in the leaf cavity of its host and supply total N requirement of the association by fixing atmospheric N_2 . It has been demonstrated that addition of combined nitrogen significantly inhibits the N_2 -fixation activity of the cyanobiont to negatively affect the growth of *Azolla*. Since the 1980's, more and more bacteria species have been found in the leaf cavity and are thought to be the third partner, bactbiont, of the symbiotic association. We explored the effect of combined nitrogen on the microbial community dominated by cyanobiont within *Azolla* at molecular and ultrastructural levels. To exclude the exotic contamination and retain the native endophyte, both the sterilized *Azolla* containing microbial community dominated by *Nostoc azollae* (AmA) and the sterilized *Nostoc azollae*-free *Azolla* (AmB) were obtained by using stem apex culture and adding combined N in the medium. The SEM showed that compared with AmB, the phenotype of AmA fronds was modified to some extent by morphology, and the structure of the microbial community within the leaf cavity of AmA was characterized by both the formation of biofilm and the algal pocket which were composed of cyanobiont, bactbiont, the host hairs and their secretions. In contrast, no biofilm and algal pocket were found in case of AmB. High throughput sequencing based on 16S rRNA and *nifH* gene indicated a remarkable diversity of microbial community within AmA cultured in N-free medium with totally 17 operational taxonomic unit (OTU) sequences, belonging to 4 phyla. A diazotroph endosymbiont consortium including *Herbaspirillum*, *Niveispirillum*, *Rhizobium* dominated by *Nostoc azollae* was found in AmA samples. Compared with AmA, the diversity of the bactbiont community in AmB samples was dramatically reduced with only 8 OTUs and the diazotrophic consortium, particularly *Nostoc azollae*, were completely disappeared. These findings showed for the first time that it is possible to improve the growth and development of host plant by altering its endophyte community composition and structure through adjusting N nutrient supply.

Key words: *Azolla*; Cyanobacterium; *Nostoc azollae*; Microbial community; High throughput sequencing; Electron microscopy