

沙棘弗兰克氏菌的生物学特性研究

吴 阳 丁 肇

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

从辽宁省西部的沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 根瘤中分离到 8 株内生菌, 它们都具有 *Frankia* 菌的典型形态特征。回接鉴定表明, 8 株菌均可使寄主结瘤。各菌株的侵染能力不同; 回接培养液的种类是影响侵染力的重要因素。分离于两个不同地区的菌株 *Frankia* sp. Hr16 和 Hr32 在 GyA 培养基上的培养特征有一定差异。实验菌株可利用多种碳源, 其中丙酮酸盐是理想碳源。在以丙酮酸盐为唯一碳源, 浓度为 10mM 的 Bap 培养基中, Hr16 菌株的对数期倍增时间可降至 40 小时, 菌体在两周内达到最大生长量。Hr16 菌株的自生固氮活性亦受碳源的影响, 在以 5mM 的丙酮酸盐的无氮 Bap 培养基中, 其活性为 176.5nmol C_2H_4 /mg 蛋白/小时。

关键词 沙棘; 弗兰克氏菌

弗兰克氏菌 (*Frankia*) 可与多种非豆科木本植物共生, 形成具有固氮能力的根瘤。自 1978 年 Callaham 等首次从香蕨木根瘤中分离到弗兰克氏菌并成功地进行了离体培养以来^[1], 现已从 9 个属的非豆科固氮树木中分离到了弗兰克氏菌纯培养物^[2]。并开展了离体条件下内生菌的形态学、生理学和分类学等方面的研究。1982 年已报道分离出沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 弗兰克氏菌的纯培养物^[3], 但对其生物学特性的研究并不多^[4-6]。鉴于沙棘不仅是非豆科固氮树种之一, 同时又是华北及辽宁的重要垦荒先锋树种, 其果实富含多种维生素, 具有重要的经济开发价值。故我们从 1983 年开始, 进行了沙棘弗兰克氏菌的形态特征、培养特征、碳源利用特性、侵染能力和自生固氮活性等方面的研究。现将结果报道如下。

材料和方法

(一) 实验菌株来源

沙棘弗兰克氏菌分离自辽宁西部新民、建平

两地的沙棘根瘤中, 见表 1。

香蕨木 (*Comptonia peregrina*) 弗兰克氏菌 Cpl1 菌株系哈佛大学 Torrey 教授赠送。

(二) 实验方法

1. 菌株分离方法: 将采集到的沙棘根瘤, 用 0.1% 的酸性升汞溶液表面灭菌 6—8 分钟, 用无菌水冲洗数遍, 切成薄片转入分离培养基中, 28℃ 黑暗中培养。

2. 形态特征: 光学显微镜观察, 用 1% 棉兰染色。电镜样品的制备方法如下: 菌体用戊二醛固定过夜, 二甲亚砷酸钠缓冲液洗二次 (每次 20 分钟), 1% 锇酸固定 24 小时。样品再用上述缓冲液洗二次, 立即进行 30%、50% 和 70% 乙醇梯度脱水, 每个梯度中停留 15—20 分钟。将样品取置于铜片上, 真空干燥表面喷涂碳金。日产 JEM-100B 型扫描电镜观察, 加速电压为 20kV。

3. 回接及侵染能力实验: 将沙棘种子经表面灭菌后, 以砂培法育苗。待小苗长出 2—4 片真叶时, 转入水培中进行实验。

接种剂系收集在有氮培养基中生长的菌体,

本文于 1986 年 3 月 11 日收到。

电镜观察承李文清、毕庶春同志协助; 胡连生同志帮助测定乙炔还原活性, 特此致谢。

用无菌水离心洗涤(2000r/min, 10分钟)。再匀浆制成菌悬液备用。

回接: 将沙棘小苗根系浸入接种剂中, 10—60分钟。然后移入盛有营养液的250ml的棕色瓶中。

营养液分别使用了 Hoagland 溶液和 Sideris-Young 溶液^[7]。培养温度 18°—24℃; 日光照 16 小时, 光强度为 8000—10000Lux。每隔两周更换营养液一次。气相色谱法测定根瘤固氮活性。

4. 培养特征: 培养特征观察采用 11 种培养基: NTW, GyA, GuA, OAT, Tap, FRB, Ycz, B/2, YM, SXT 和 STR^[1]。实验菌株经无菌水洗涤后匀浆, 接种于各种培养基上。28℃ 黑暗中培养, 第 7 周观察结果。

5. 碳源利用和生长曲线: 供试碳源先经过滤膜灭菌, 再加入到已灭菌的无碳源 Bap 培养基中^[9], 分装 8ml/试管。实验菌株先在以酪素为氮源、以吐温 80 为碳源的 Bap 培养基中生长 30 天, 再离心收集菌体, 洗涤三次(2000r/min, 10分钟)。匀浆后定量接种于试管中。培养温度 28℃。定期取样测定其碱水解蛋白质, 作为生长量指标^[10]。

6. 自生固氮活性测定: 制备无氮的 Bap 培养基, 分装 18 × 180mm 试管, 每管 5ml。实验菌株在有氮 Bap 培养基中培养 20 天后, 离心充分洗涤除去 NH_4^+ , 匀浆成菌悬液, 均匀接种各试管中。

自接种后 12 小时起, 每隔 48 小时, 取 3 支试管测定其 48 小时内的乙炔还原活性。乙炔注入量为 10%。所用气相色谱仪为上海分析仪器厂 100 型。

结果与讨论

(一) 菌种分离

采用不同分离培养基, 其分离到 8 株沙棘弗兰克氏菌(见表 1)。其中 7 株分离时采用 Jan Blom 斜面。虽然使用 Qmod 液体培养基也分离到一株, 但其分离培养时间要比前者长得多。因此, Jan Blom 斜面是较适合于沙棘弗兰克氏菌的分离的。

(二) 形态特征

沙棘弗兰克氏菌在无氮 Bap 培养基中, 菌丝较直、有分枝, 直径为 0.7—1.0 μm 。棉兰染色可见菌丝分隔。顶囊(vesicle)呈球状, 着生于菌丝侧向生出的小柄上, 直径多为 1.8—2.4 μm , 大者可达 3.3 μm (图版 I-1、2)。孢子囊形态多样, 有圆形、椭圆形, 个别为细长棒状; 大小为 8—15 μm , 成熟者达 30 μm (图版 I-3)。幼小孢子囊有明显的横分隔, 随着发育纵向分隔出现、增多, 成熟时顶端破裂, 释放出孢囊孢子。光学显微镜和扫描电镜观察, 未见有孢子囊壁。孢子多为不规则的多面体, 直径约 1.5—2.0 μm (图版 I-4)。

(三) 回接及侵染能力

对分离到的 8 株沙棘弗兰克氏菌进行的回接鉴定表明, 它们均可侵染寄主, 形成根瘤。最早的侵染表现为白色膨大, 在接种后的第 14 天即可观察到。随后发育成幼小根瘤, 在 30—40 天时, 形成根瘤簇(图版 I-5、6)。

采用不同培养液进行回接实验, 观察到 8 株菌的侵染寄主能力并不一致(见表 2)。

表 2 表明, 营养液种类是影响菌株侵染结瘤能力的因素之一。回接 14 天时, Sideris-Young 营养液中已有 6 株菌发生侵染; 而 Hoagland 营养液中仅有 3 株菌侵染。因此, Sideris-Young 营养液更适合于沙棘弗兰克氏菌的早期侵染。

各菌株在两种营养液中的侵染能力有所不同。在 Hoagland 营养液中, Hr8 和 Hr32 菌株的结瘤率和平均结瘤数明显高于其它菌株。但这两株菌在 Sideris-Young 营养液中则没有表现出这种优势。相对来说, Hr16 菌株则在 Sideris-Young 营养液中更容易侵染其寄主。各株所适宜侵染的营养液种类的这种差异, 反映了它们侵染结瘤时所适应的环境条件的差异, 也可能

表 1 菌种分离结果

Table 1 The result of *Frankia* strains isolated from nodules of *Hippophae rhamnoides*

菌株 Strains	分离培养基 Media	分离培养时间(天) Days of inoculation	寄主来源 Source of host
Hr8	Jan Blom 斜面	22	辽宁建平 Liaoning Jianpin
Hr21	Jan Blom 斜面	27	辽宁建平 Liaoning Jianpin
Hr32	Jan Blom 斜面	12	辽宁建平 Liaoning Jianpin
Hr16	Jan Blom 斜面	27	辽宁新民 Liaoning Xinming
Hr18	Jan Blom 斜面	35	辽宁新民 Liaoning Xinming
Hr30	Qmod 液体培养基	60	辽宁新民 Liaoning Xinming
Hr34	Jan Blom 斜面	未记录 un recording	辽宁新民 Liaoning Xinming
Hr37	Jan Blom 斜面	未记录 un recording	辽宁新民 Liaoning Xinming

表 2 8 株沙棘 *Frankia* 侵染寄主和结瘤能力

Table 2 Intfection and nodulation of eight *Frankia* sp. Hr. strains for their host seedlings

菌 株 Strains	Hoagland				Sideris-Young			
	30 天 (d)		40 天 (d)		30 天 (d)		40 天 (d)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Hr8	*3/3	7.7	3/3	11.7	*6/6	2.5	6/6	3.7
Hr32	*3/3	10.7	2/2	13	*5/6	2.2	5/5	3.6
Hr21	1/3	1	1/3	1	2/6	3.5	2/4	2
Hr16	1/3	1	2/3	1	*6/6	4.5	5/5	11.2
Hr18	3/3	3.3	3/3	5.7	*5/6	1.8	5/6	2.6
Hr30	2/3	1.5	3/3	15	2/6	1	2/6	1
Hr34	*3/3	6.3	3/3	8.7	6/6	3.3	5/5	3.4
Hr37	2/2	2.5	2/2	4	*6/6	3.5	6/6	6.8
未接种对照 Control of no inoculation	0/3	0	0/3	0	0/6	0	0/6	0

注：A：结瘤植株数/回接植株总数

No. seedlings nodulated/no. seedlings inoculated

B：平均根瘤数

No. nodules of each seedling nodulated

* 回接后 14 天即观察到侵染膨大或幼小根瘤

Prenodules or swells were observed at 14th day after inoculating with *Frankia* Hr. strains

间接地表明它们在自然界中所适应的生态条件的某些不同。这对于深入研究弗兰克氏菌的侵染结瘤，以及根据不同生态类型选用不同菌剂的研究均有一定启发。

回接后 60 天，测定了 Hr16 和 Hr32 菌株在 Sideris-Young 营养液中的共生固氮活性，其结果分别 0.784 和 0.205 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g}$ 鲜瘤/小时。

(四) 培养特征

选用 Hr16 和 Hr32 菌株作为新民、建平两地的代表菌株，Cp11 菌株也作为实验菌株以进行比较。接种后第 7 周的观察结果列于表 3。

Hr16 和 Hr32 菌株在多数培养基上的生长情况一致：在 FRB 上生长极好；在 Ycz 和 STR 上次之；在 B/2 和 YM 上不生长；在 NTW 和 OAT 上生长较差。而 Cp11 则能在多数培养基上良好生

表 3 Hr16、Hr32 和 Cp11 菌株的培养特征

Table 3 Cultural characteristics of *Frankia* sp. Hr16, Hr32 and Cp11

培养基* Media	菌株 Strains		
	Hr16	Hr32	Cp11
NTW	+	+	-
GyA	-	+++	+++
GuA	++	+++	+++
OAT	+	+	++
Tap	+	-	-
FRB	+++	+++	+++
Ycz	++	++	
B/2	-	-	++
YM	-	-	++
SXT	-	+	-
STR	++	++	

* NTW: 营养琼脂 nutrient agar supplemented with 0.2% Tween 80; GyA: 甘油天门冬素琼脂 glycerol asparagine agar; GuA: 葡萄糖天门冬素琼脂 glucose asparagine agar; OAT: 燕麦片琼脂 oatmeal agar; Tap: 自来水琼脂 tap water agar; FRB: 弗兰克氏肉汤琼脂 *Frankia* broth agar; Ycz: 蔗糖硝酸盐琼脂 + 0.4% 酵母浸提液 Czapek's agar supplemented with 0.4% yeast extract; B/2: 1/2 葡萄糖消化酪素酵母牛肉汁琼脂 Bennett's agar, onehalf strength; YM: 葡萄糖酵母膏牛肉汁琼脂 yeast malt; SXT: 土壤浸提液琼脂 soil extract agar; STR: 1/5 FRB + 5% 土豆淀粉 *Frankia* broth agar, one-fifth strength, supplemented with 5% purified potato starch.

+++：生长极明显 growth excellent

++：明显生长 growth good

＋：稍有生长 growth poor

－：不生长 no growth

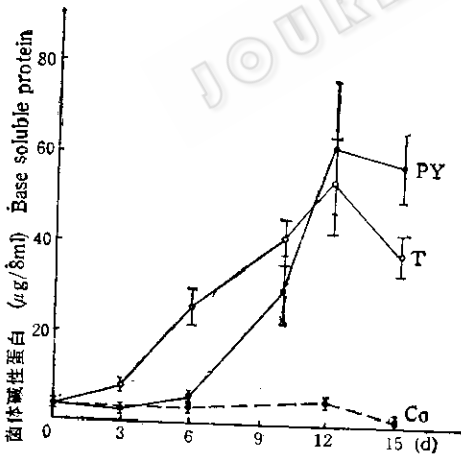


图 1 Hr16 菌株的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *Frankia* sp. Hr16

PY: 以丙酮酸钠为碳源 (10mM) pyruvate as sole C-source T: 以吐温 80 为碳源 (1g/L) Tween 80 as sole C-source Co: 无任何碳源的对照 control of no C-source

长。可见两个属的树种间——沙棘属和香蕨木属的差别还是明显的。但在 GyA 培养基上, Hr32 菌株表现出与 Cp11 菌株相同的特征,而与 Hr16 菌株不同。

(五) 碳源利用和生长曲线

菌株 Hr16 和 Hr32 对试验的 5 种碳源: 葡萄糖、丙酮酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐(含量均为 180mg/L 培养基)和吐温 80 (1g/L) 都能利用。但以丙酮酸钠为唯一碳源时, 菌体生长最快; 葡萄糖和吐温 80 次之; 琥珀酸钠能维持一定的生长; 丙酸钠则生长最慢。

根据上述实验结果, 选择了丙酮酸钠和吐温 80 分别作为唯一碳源, 测定了 Hr16 菌株的生长曲线, 结果见图 1。

以吐温 80 为碳源的生长曲线, 延迟期较短, 这与前培养也是以吐温 80 为碳源可

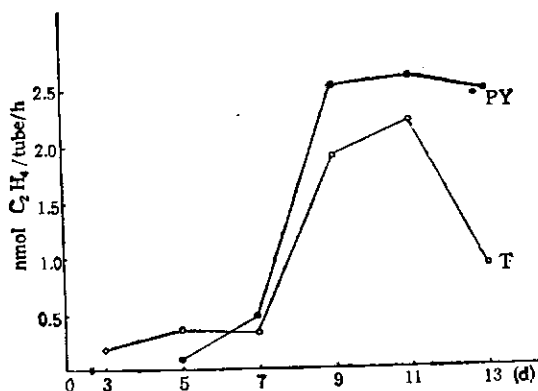


图2 Hr16 菌株在不同碳源上的自生固氮活性曲线

Fig. 2 Acetylene reduction curves of *Frankia* sp.

Hr16 on medium with various carbon source

PY: 以丙酮酸盐为碳源 Pyruvate as sole C-source

T: 以吐温 80 为碳源 Tween 80 as sole C-source

能有关。进入对数期后,两种碳源的曲线发生显著变化。丙酮酸钠上菌体增长速率超过了吐温 80 上的。生长至 12 天时,菌体达到最大生长量。对照中,菌体几乎不生长。Hr16 菌株在以丙酮酸钠和吐温 80 为碳源的培养基上的对数期倍增时间分别为: 40 小时和 77 小时。两者差异明显。

在以上两个实验中,丙酮酸盐的浓度分别采用了 5mM 和 10mM,但都能被实验菌株良好地利用,而且均优于其它实验碳源。因此表明,丙酮酸盐是沙棘弗兰克氏菌营养细胞生长的理想碳源。其浓度为 10mM 时,菌株的倍增时间可降至 40 小时。这在文献中尚未报道。同时,菌体的生长周期可在两周内完成,这也为实验室内大量培养沙棘弗兰克氏菌提供了基础资料。

(六) 自生固氮活性

菌株 Hr16 在分别以丙酮酸钠和吐温

80 为碳源的无氮 Bap 培养基中的自生固氮活性进程如图 2 所示。

Hr16 菌株的乙炔还原活性在无氮诱导后的 3—5 天出现,第 10 天左右达到最高。自生固氮活性的进程受到培养基中碳源种类的影响。以丙酮酸钠为碳源时,乙炔还原活性的表达有一个较长的延迟期。但第 7 天后,则迅速上升,超过了以吐温 80 为碳源的诱导物。在诱导第 10 天时所测定的 Hr16 菌株在以丙酮酸钠 (5mM) 和吐温 80 (1g/L) 为碳源的无氮培养基中的乙炔还原活性分别为: 176.5 和 77.5 nmol C₂H₄/mg 蛋白/小时。因此可以认为,丙酮酸钠能更有效地诱导 Hr16 菌株的自生固氮活性的表达。

参 考 文 献

- [1] Callahan, D. et al.: *Science*, 199: 899—902, 1978.
- [2] Akkermans, A. D. L. et al.: *Advances in Nitrogen Fixation Research*, C. Veeger and W. E. Newton eds., Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, pp. 311—319, 1984.
- [3] Shipton, W. A. and A. J. P. Burggraaf: *Plants and Soil*, 69, 149—161, 1982.
- [4] 杜大至等: *微生物学报*, 24(1): 41—45, 1984.
- [5] 杨慧凡等: *微生物学报*, 24(4): 315—319, 1984.
- [6] 杜大至等: *微生物学报*, 25(3): 197—203, 1985.
- [7] 休伊特, E. J. (崔激等译): 《植物营养研究的砂培与水培法》, 科学出版社, 北京, 第 91—98 页, 1965.
- [8] Baker, D. and J. G. Torrey: *Can. J. Microbiol.*, 26 (9): 1066—1071, 1980.
- [9] Murry, M. A et al.: *Plant and Soil*, 78: 61—78, 1984.
- [10] Burggraaf, A. J. P. and W. A. Shipton: *Plants and Soil*, 69: 135—147, 1982.
- [11] Lechevalier, M. P. et al.: *Developments in Industrial Microbiology*, 23: 50—60, 1981.

STUDIES ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *FRANKIA* SP. FROM *HIPPOPHAE RHAMNOIDES*

Wu Yang Ding Jian

(Institute of Forestry & Soil Science, Academia Sinica, Shenyang)

Eight actinomycetous endophytes were isolated from the root nodules of *Hippophae rhamnoides* L. collected in the eastern district of Liaoning province. All of them have the typical morphological characteristics of *Frankia*, and infected and nodulated their hosts efficiently. The infecting abilities of these isolates are different from each other, and vary with the kinds of the solutions used for inoculating the seedlings of host. The strains isolated from two different districts showed different cultural characteristics when grown on the GyA medium. The strains tested can utilize a number of carbohydrates as sole C-source. Among them, the pyruvate is found to be the best one. When the concentration

of pyruvate used as sole C-source is 10 mM in the Bap medium, the doubling time of *Frankia* sp. Hr16 can be dropped down to 40 h in the log period, and the maximum growth yield is reached in the two weeks after inoculation. The strain Hr16 showed the nitrogen-fixing activity in vitro in N-free medium, which was influenced apparently by the sort of C-source in the N-free medium. 176.5 nmol C_2H_4 /mg protein/h was assayed when the strain grown in the N-free Bap medium containing 5 mM pyruvate as sole C-source.

Key words

Hippophae rhamnoides; *Frankia*

图 版 说 明

Explanation of plate

沙棘弗兰克氏菌的形态和结瘤情况 (标尺均为 1 μ m)

1. 菌株 Hr34 的菌丝, B: 菌丝分枝, S: 菌丝上的膨大。
2. 菌株 Hr16 的顶囊, V: 顶囊, P: 顶囊柄。
3. 菌株 Hr32 的孢子囊。
4. 示菌株 Hr32 的孢子, Sp: 孢子。
- 5, 6. 菌株 Hr34 回接寄主 37 天时形成的根瘤。

Morphology of *Frankia* sp. Hr. strains and nodules induced by the strains (bar = 1 μ m)

1. Hyphae of *Frankia* sp. Hr34, B: branch of hypha; S: swell on hypha.
2. Vesicle of *Frankia* sp. Hr16, V: vesicle; P: peduncle of vesicle.
3. Sporangium of *Frankia* sp. Hr32.
4. Spore of *Frankia* sp. Hr32, Sp: spores.
- 5, 6. Nodules induced by *Frankia* sp. Hr 34 at 37th day after inoculation.