

非豆科植物共生固氮的研究

II. 沙棘根瘤内生菌的分离与回接

杜大至 王毅岩 崔国良

(山西省生物研究所, 太原)

用组织培养的方法,从沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 根瘤中分离到一种孢囊放线菌。其菌丝分枝、有横隔、末端膨大形成谷穗状孢囊,孢囊破裂后释放出球形或椭圆形孢囊孢子;菌丝断裂可形成多种形态的拟类菌体。回接试验的结果证明,它对沙棘幼根具有侵染能力。接种 8 天后即可结瘤,6 个月后结瘤率达 100%,平均每株结瘤 88 个。固氮酶活力达到 36.23 n mol $C_2H_4/g \cdot \text{鲜重} \cdot \text{min}$ 。接种植株与对照相比,地上部分干重增加近 3 倍,含氮量增加 77.9%。试验证实了这株孢囊放线菌确属沙棘根瘤内生菌。

关键词 沙棘;内生菌;固氮;分离

非豆科植物根瘤内生菌的分离工作,从 1910 年开始,经历了近 70 年的时间,直到 1978 年才由美国的 Callaham 等首次从香蕨木属植物根瘤中分离出来。

用组织培养的方法分离内生菌,1974 年以前就有人进行过尝试,但始终未能成功。当时认为内生菌在组织转移中已经丧失^[1]。1975 年,Becking 将 *Alnus cremastogynae* 根瘤的愈伤组织接种到无菌苗木的根部,结果长出了根瘤,明确证实了接种物的存在^[2]。次年,他又对 *Alnus glutinosa* 根瘤内生菌与愈伤组织间的联合固氮体系进行了研究,结果发现内生菌虽未侵入愈伤组织细胞,但却存在于愈伤组织的表面或细胞间隙。不过,当时未能获得这些内生菌的纯培养^[3]。

我们从 1980 年开始,对组织培养分离内生菌的方法进行了研究,并从沙棘根瘤中重复分离到一批孢囊放线菌。为了证实这种放线菌确属沙棘根瘤内生菌,选典型菌株进行了回接并获得成功。证明用组织培养法分离非豆科植物根瘤的内生菌,是一种行之有效的分离手段。

材料和方法

(一) 菌种分离

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 是胡颓子科的一个重要结瘤固氮树种。试验所用样品分别于 1980 年 11 月,1981 年 5 月、10 月、11 月采自太原古交西山海拔 1,100 米的山坡地带。

1. 根瘤表面灭菌: 将新鲜根瘤装入纱布袋中,用自来水充分冲洗,把根瘤装入古氏坩锅中,在 95% 乙醇中浸 1 分钟,用无菌水冲洗干净,再浸入 0.1% 酸性 $HgCl_2$ 中 10 分钟,用无菌水充分洗涤后备用。

2. 根瘤的组织培养: 用无菌刀片切去上述根瘤的柄部,接种到装有修改的 MS 培养基的 50 ml 三角瓶中,每瓶接种根瘤 3—4 个。注意横断面必须插入培养基中,然后置于 27°C 遮光培养。培养后应及时将长有细菌和霉菌的根瘤淘汰。20 天后,将根瘤和愈伤组织转移到新鲜培养基上。

3. 内生菌的鉴别和转接: 当愈伤组织上长

本文于 1982 年 8 月 20 日收到。

本工作承阎逸初、杜竹铭教授关怀指导。扫描电镜制片、照相由山西省电镜测试中心王济、白春生老师及范建同志协助;气相色谱分析及彩色照相分别由本所技术室莫海云、王保康同志承担;植株含氮量由山西省农业测试中心测定,在此一并致谢。

出与内生菌相似的菌落后,采用涂片负染法^[4]对它们进行形态上的鉴别,及时将典型的内生菌菌落转接到适宜生长的培养基上。

(二) 回接试验

1. 供试菌株的培养: 供试菌: HR 104 菌株。在 250 ml 的三角瓶内装入 40 ml 修改的 MS 液体培养基, 接种后置于 28℃ 下, 摇床振荡培养 20 天。

2. 回接方法和水培液的配制: 回接试验采用水培法。玻璃水培缸的盖上加有水培器管套。密封后的水培缸用 4% 福尔马林溶液灭菌^[5], 再用灭过菌的棉花塞住水培器管套及盖孔。

水培液采用经我们修改的 Sideris-Young 无氮营养液^[6]。灭菌冷却后即可倒入水培缸内。以后每季补液一次。空气交换通过盖孔的棉花进行。

3. 沙棘种子表面灭菌及催芽: 选大小均一、饱满、无伤残的种子在 0.2% 酸性 HgCl₂ 中灭菌 10 分钟, 然后用无菌水充分冲洗后装入培养皿内, 在 40℃ 下无菌浸种 24 小时。种子催芽采用试管法^[7], 于 27℃ 遮光条件下催芽 6 天, 待主根长到 5—6cm 时即可接种。

4. 接种和幼苗的培养条件: 用离心沉淀收集菌体, 经无菌的组织研磨器破碎后制成菌悬液。将幼根沾上菌液, 用棉塞包裹靠近子叶的主根, 插入水培器管套内, 每株再加菌悬液 1ml, 对照加等量液体培养基。

温室中的沙棘植株为自然光照, 但根部遮光。季节及昼夜温度变化在 15—35℃ 之间。

5. 根瘤内生菌的形态观察: 回接根瘤中菌体形态的光学显微镜和扫描电镜观察, 均在相同测试条件下, 按涂片法^[4]进行。

6. 根瘤固氮活性和植株含氮量的测定: 供试材料采自本所温室。用乙炔还原法测定根瘤固氮活性。测试仪器: 津岛 GC-5A 型气相色谱仪, 测试温度: 13℃。植株含氮量用凯氏定氮法测定。

结果与讨论

(一) 根瘤的组织培养

根瘤接种在 MS 培养基中后, 一般在

一周左右便开始出现愈伤组织。在以后的转移培养中, 愈伤组织还会不断形成。只要不发生污染, 其诱导率一般可达 70% 以上。一个月后, 在愈伤组织的表面或侧面, 会长出一些与内生菌较为相似的放线菌菌落, 应通过显微观察予以淘汰。

在组织培养中, 根瘤的表面往往很难做到彻底灭菌。但由于培养基中营养成分比较完全, 特别是加入了蛋白质水解物, 所以一般的细菌和霉菌在早期培养中就会因迅速生长而被及时淘汰。

(二) 内生菌菌落的形成

经过 3 个月左右的组织培养, 内生菌便开始从愈伤组织上长到人工培养基中。沙棘根瘤的内生菌, 一般从愈伤组织的表面或侧面长出, 当菌落扩大后便长到附近的培养基上 (图版 I-1)。这种菌落呈瘤状凸起、半透明、有光泽、质地较坚韧, 用镊子夹取时往往连培养基一同撕起。菌落颜色初呈蛋壳黄或瓜瓤粉, 最后成为北瓜黄乃至桔橙色。但这并非典型的单菌落。转接后的单菌落呈圆形、低凸面、直径 1—2 mm。初呈半透明、有光泽、粉白色, 培养中颜色加深, 最后呈桔橙色。内生菌不生成气生菌丝, 基内菌丝在培养基表层生长良好, 但培养日久也可长入培养基浅层。这种菌在人工培养基上生长缓慢, 一般半月左右才能长成明显的菌落, 一个月后才长得比较丰满 (图版 I-2)。在冰箱中保存半年以上的菌种, 转接后仍可成活。离体培养的内生菌一年以后仍可侵染寄主植物并结瘤。

(三) 内生菌的菌体形态

要获得内生菌的人工纯培养物, 必须对其菌体进行严格细致的形态鉴别, 这也是分离内生菌的关键步骤之一。

沙棘根瘤内生菌的菌丝体粗细不匀、分枝、有横隔、直径 0.5—1.4 μm。在任何部

位都可发生膨大, 形态类似分生孢子。菌丝的某些部位, 还可长出一个柄, 柄端长出一个球形体, 这与根瘤涂片中所见到的孢囊相似。菌丝体的末端膨大, 形成棒状体, 棒状体继续膨大, 就形成孢囊。孢囊呈椭圆形、棒槌状、葫芦状或谷穗状, 大小为 $3-8 \times 5-25 \mu\text{m}$ (图版 I-3)。孢囊破裂后, 释放出大量孢囊孢子, 这些孢子呈不规则的球形或椭圆形, 直径 $1.7-3.4 \times 2.2-4 \mu\text{m}$ (图版 I-4)。

人工纯培养的内生菌在形态上与用根瘤直接涂片所观察到的内生菌极为相似, 只是在菌体大小、孢囊形态等方面有一些差异。这可能是由于在人工纯培养中, 环境条件发生了较大改变的缘故。

(四) HR 104 菌株的回接

HR 104 菌株的侵染能力是明显的。接菌 8 天后沙棘幼根就开始出现瘤状突起 (图版 II-1, 2)。半月后形成明显的根瘤 (图版 II-3)。回接试验重复四次, 均得到明显一致的结果, 而对照没有一株结瘤。这种人工纯培养的内生菌, 对沙棘幼嫩的主根和侧根都有侵染力, 但对于较老的根, 尤其是已经木栓化的根, 除原结瘤处可形成根瘤簇外, 再不能进行新的侵染。随着寄主植物的生长, 新长出的幼根也会不断结瘤, 尤其是接种 3-6 个月时, 结瘤数大量增加 (表 1)。而接菌后暂时未能结瘤的植

株, 日后也会相继结瘤。

幼嫩的根瘤呈象牙黄或乳白色; 成熟的根瘤着生部位呈土黄或淡棕色, 而顶端仍呈乳白色; 较老的根瘤逐渐成为咖啡色乃至棕褐色。单个根瘤呈二叉或多叉分枝, 宽约 1-2mm; 簇生根瘤呈绣球状, 直径可达 2cm (图版 II-4)。这些特征, 均与野生根瘤一致。

土壤中的内生菌在侵染寄主后, 由于它能产生一种生长素类物质^[1], 促使寄主的皮层细胞迅速分裂, 增加大量新的细胞, 因而使幼根向根瘤的反方向发生弯曲。这种现象在回接试验中表现得十分明显, 其弯曲程度有时可达 90° (图版 II-1, 2)。表明 HR 104 菌株能够产生这类生长素。

(五) 沙棘植株结瘤后的生长状况

接种的沙棘苗木, 初结瘤时生长状况较对照并无明显差别。这是因为在幼苗未建立共生固氮体系以前, 水培液中曾补给了少量氮素。而正常生长 6 个月后, 结瘤植株与对照相比, 株高增加 47.2%; 分枝数增加 1.8 倍; 地上部分干物重增加近 3 倍, 含氮量增加 77.9%。此时, 对照因严重缺氮已变得枝叶枯黄、叶片凋落。而结瘤植株除主枝的部分叶片因温度较低而发黄脱落外, 整个植株仍枝叶繁茂 (图版 II-5, 表 2)。说明由于内生菌的固氮作用, 已经明显改善了沙棘植株的氮素营养状况。

表 1 HR 104 菌株的侵染结瘤能力

Table 1 Infection and nodule formation ability of strain HR 104

处 理 Treatment	株 数 Plant number	结瘤率(%) Nodule formation rate			结瘤数 (个/株) Nodules number (per plant)		
		时间(月) Time (month)			时间(月) Time (month)		
		1	3	6	1	3	6
接 种 Inoculation	51	43	86.8	100	2.6	13.4	88
对 照 Control	12	0	0	0	0	0	0

表2 沙棘植株接种6个月后的生长状况

Table 2 Growth of *H. rhamnoides* L. six months after inoculation

处理 Treatment	株数 Plant number	平均株高 (cm) Average height	平均分枝 (枝/株) Average number of branches	地上部分干重 (g/株) Dry weight above ground (g/plant)	含氮量 Nitrogen content	
					%	mg/株 mg/plant
接种 Inoculation	51	28.1	4.4	1.02	2.9	29.53
对照 Control	12	19.1	1.6	0.26	1.63	7.49

表3 沙棘根瘤乙炔还原能力的测定

Table 3 Acetylene-reducing activity of root nodules of *H. rhamnoides* L.

处 理 Treatment	乙炔还原活力 (n mol C ₂ H ₄ /g· 鲜重·min) C ₂ H ₂ reducing activity (n mol C ₂ H ₂ /min. g. f. wt.)	固氮活力 (n mol 氮固定/g· 鲜重·min) N ₂ -fixing activity (n mol N ₂ fixed/min.g.f. wt.)
成熟根瘤 + C ₂ H ₂ Mature root nodules + C ₂ H ₂	36.23	15.10
幼嫩根瘤 + C ₂ H ₂ Young root nodules + C ₂ H ₂	29.06	12.11
老化根瘤 + C ₂ H ₂ Senescent root nodules + C ₂ H ₂	9.13	3.80
根 + C ₂ H ₂ CK Root + C ₂ H ₂	1 × 10 ⁻⁶	-

(六) 根瘤内生菌菌体形态的观察

对回接根瘤的内生菌作光学显微镜和扫描电镜观察,其菌丝体、孢囊、孢囊孢子 and 拟类菌体的形态及表面结构,与用野生根瘤涂片所观察到的结果^[4]相同(图版 I-5—10)。但回接根瘤中拟类菌体极少,从大量涂片观察中,均未能看到菌丝断裂成拟类菌体的过程,这可能与它的生活环境有关。

(七) 根瘤固氮活性的测定

对水培的沙棘根瘤进行乙炔还原能力的测定,结果表现出明显的固氮活力(表3)。

根瘤固氮活力的高低是与光照和温度密切相关的。我们在1981年5月下旬测定过野生沙棘根瘤的固氮活性,其乙炔还原活力达到161 n mol C₂H₄/g·鲜重·min。

回接根瘤的乙炔还原活力之所以较低,是因为测定在冬季进行,不但光照不足,且温室中昼夜温差只有9—18℃。

回接试验的结果,证实了HR104菌株确属沙棘根瘤内生菌。可见用组织培养的方法分离非豆科植物根瘤的内生菌,虽然周期较长,分离机率还不够高,但与国际上目前所采用的各种方法相比,在试验程序、方法、设备等方面都比较简单。因此,可以认为这是一种分离内生菌的有效手段。

参 考 文 献

- [1] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 701—706, 1974.
- [2] Becking, J. H.: *In the Development and Function of Root* (ed. by Torrey, T. G. and D. T. Clarkson), Academic Press, 505,

- 1975.
- [3] Becking, J. H.: In *Recent Developments in Nitrogen Fixation* (ed. by Newton, W. et al.), Academic Press, London, New York, San Francisco, 551—567, 1977.
- [4] 杜大至、王毅岩: 微生物学报, 23 (4): 347—350, 1983.
- [5] 周平贞等: 中国油料, 2: 60—62, 1979.
- [6] E. J. 休伊特: 植物营养研究的砂培与水培法, 崔激等译, 科学出版社, 91页, 1965.

STUDIES ON SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION OF NON-LEGUMINOUS PLANTS II. ISOLATION AND INOCULATION OF ROOT NODULE ENDOPHYTE FROM *HIPPOPHAE RHAMNOIDES*

Du Dazhi Wang Yiyang Cui Guoliang

(Shanxi Institute of Biology, Taiyuan)

A number of strains of actinomycetes with sporangia have been isolated from the root nodules of *Hippophae rhamnoides* L. by tissue culture. Their mycelia are septate, branched, and swollen into millet-ear-like sporangia. These sporangia release spherical or elliptical spangiospores during rupture. During bursting, the mycelia become bacteroid-like cells of varied shapes, which are much like the endophyte observed by the smearing method of root nodules. Back inoculation experiments demonstrated its ability of infecting young roots of *H. rhamnoides*. The root nodules were formed from 8 days to 6 months after inoculation. The nodules were formed on all tested

plants. Microscope and scanning electron microscope observation proved that the root nodules and the endophyte both were similar to the natural ones. The nitrogenase activity reached to 36.23 n mol C₂H₄/g.f.wt./min. The height of plants increased by 47.2%, branching number increased by 1.8 times, weight of dry substance above ground increased nearly by three times, and the content of nitrogen increased by 77.9%. As compared with the uninoculated plants as control it is therefore concluded that the strain HR 104 is a true endophyte of *H. rhamnoides*.

Key words

Hippophae rhamnoides; Endophyte; Nitrogen fixation; Isolation