

## 沙棘和胡颓子属根瘤放线菌的分离和回接

杨慧凡 蒋建德 黄家彬 朱宝琴  
钟玉华 刘惠昌 杨碧芳 赵振英  
(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

从胡颓子属 (*Elaeagnus*) 黄果沙枣 (*Elaeagnus oxycarpa* Schlecht.) 根瘤上分离得到放线菌 *Frankia* sp. Eoc 85、*Frankia* sp. Eoc 811。从沙棘 (*Hippophae rhamnoides*) 根瘤中分离得到放线菌 *Frankia* sp. Hrc 97、*Frankia* sp. Hrc 922。又从多花胡颓子 (*Elaeagnus multiflora* var. *ovata*) 及角花胡颓子 (*Elaeagnus gonyanthes*) 的根瘤中分离得到 *Frankia* sp. Emoc 1211 和 *Frankia* sp. Egc 107, 均获得纯培养。用光学显微镜和扫描电镜观察其形态特征, 确认是属具有孢囊的放线菌。该菌慢生长型, 无气生菌丝体, 基内菌丝体发育好。液体培养, 在底部生长, 属于微好气性。孢囊形状不规则, 囊内包着大量的不游动的孢囊孢子。菌丝分枝有隔, 粗细不匀, 革兰氏阳性。将分离菌 Eoc 85、Eoc 811、Hrc 97、Emoc 1211、Egc 107 回接其宿主, 均感染结瘤。根瘤的乙炔还原活力分别为: 6.05、2.68、0.63、7.15、3.53  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g} \cdot \text{鲜重} \cdot \text{h}$ 。

**关键词** 沙棘; 胡颓子属; 弗兰克氏菌

自从 1978 年由美国的 Callahan 等首次从香蕨木根瘤中分离出内生菌之后<sup>[1]</sup>, 在许多国家也相继分离得到 *Frankia* 菌的离体培养。1981 年我们用蔗糖离心法从四川桉木根瘤中分得第一株纯培养的 *Frankia* 菌。1982 年又曾多次从非豆科固氮树木根瘤中获得 *Frankia* 放线菌。用所分得的菌株, 回接到原宿主苗木, 形成根瘤, 有固氮活性。

### 材料与 方法

#### (一) 树木根瘤

黄果沙枣 (*Elaeagnus oxycarpa* Schlecht.)、沙棘 (*Hippophae rhamnoides*) 根瘤采自温室外沙培盆栽的三年生苗木; 多花胡颓子 (*E. multiflora* var. *ovata*) 和角花胡颓子 (*E. gonyanthes*) 根瘤是取自温室内土培盆栽的三年生苗木, 当年形成的根瘤。

#### (二) 分离方法

取新鲜根瘤, 洗净, 在 0.1% 酸性升汞溶液

表面灭菌 5—10 分钟, 用无菌水冲洗除去消毒剂。切下根瘤瓣, 置于研钵中研磨, 加少许无菌水, 研匀, 通过玻璃棉滤去根瘤碎片。取滤液稀释至 20—30 倍<sup>[2]</sup>。再取稀释液 1—2 滴接种于琼脂斜面或平板上, 在 26—28℃ 培养。也可用 0.1% 溴水表面灭菌, 将根瘤切成薄片, 置于琼脂斜面或平板上。

培养基: 用 QMOD 的基本成分, 加少量微量元素和维生素等<sup>[3-5]</sup>。

#### (三) 回接宿主试验

##### 1. 宿主幼苗的培育:

将黄果沙枣种子用热水浸泡, 过氧化氢消毒 10 分钟, 播种于水洗过并灭菌的沙子上, 待长出幼苗, 移至 Sideris-young 1/2 氮营养液的水培瓶中培养<sup>[6]</sup>。待幼苗根系生长正常时, 即用于回接试验。沙棘、角花胡颓子、多花胡颓子采用水培插条的幼苗, 待根系生长至 6—7 cm 时, 用于回接试验。

本文于 1983 年 3 月 23 日收到。

扫描电镜照片由毕庶春同志拍摄, 谨致谢意。

回接试验所用之容器与营养液均经灭菌。

## 2. 回接感染试验:

取纯培养 1—2 个月的分离菌,用无菌水洗掉菌体上的培养基,而后研匀,加少量无菌水,接种于幼苗根系上。

将接种 Eoc 85、Eoc 811 菌株的黄果沙枣幼苗栽于二种基质上:一组用无氮水培;另一组栽于经水洗过,高压灭菌的膨化珍珠岩上。对照不接菌。沙棘、多花胡颓子、角花胡颓子接种分离菌后,分别栽于水培瓶或珍珠岩基质上,对照不接菌。以上苗木均以无氮的 *Sideris-young* 营养液浇灌。

上述试验在控制生长环境的培养室中培养。光-暗循环分别为 16—8 小时,昼夜温度 18—25℃,光照为 2,800—3,600 Lux (ZD-II 型照度计)。

## 结 果

### (一) 分离菌的一般特征

1982 年 8—12 月先后用系列稀释法和切片法从黄果沙枣根瘤中分离得到 2 株放线菌,定名 *Frankia* sp. Eoc 85、*Frankia* sp. Eoc 811。从沙棘根瘤中分得二株内生菌: *Frankia* sp. Hrc 97、*Frankia* sp. Hrc

922。从角花胡颓子与多花胡颓子根瘤上分离出内生菌分别为: *Frankia* sp. Egc 107、*Frankia* sp. Emoc 1211。它们的形态特征基本相似。2—3 周长出肉眼可见的白色菌落,致密,呈丝状放射形生长。基内菌丝体发育好,无气生菌丝体。液体培养在底部呈团絮状生长,培养液不混浊,该菌属微好气性,慢生长型,革兰氏染色阳性。经光学显微镜和扫描电镜观察,确认是属于具有孢囊特征的放线菌。它们的形态特征是:菌丝弯曲,分枝有隔,粗细不匀,直径 0.6—1.4  $\mu\text{m}$ , 菌丝中间或末端膨大形成孢囊(图版 I-5、6)。孢囊形状呈不规则的圆形、椭圆形、锥形等,大小不一,通常约 3—35  $\mu\text{m}$ , 表面不光滑,有的有粗大的孢囊柄,柄上有横隔(图版 I-1—3 及图 1-2)。成熟的孢囊壁破裂释放出大的孢囊孢子,孢子呈不规则的圆形,不游动,直径 1.5—2  $\mu\text{m}$  (图版 I-1, 图 1-1)。孢囊体 (Vesicles) 表面呈光滑的球形或卵形,着生在菌丝体一侧的细小分枝上(图版 I-4、6)直径 3—4  $\mu\text{m}$ 。在诱导培养基上,有固氮酶活性。

表 1 回接宿主感染结瘤和苗木生长情况

Table 1 Nodulation and growth of reinfected hosts

宿主名称	生长基质	菌株名称	接菌情况	结瘤数 (个/株)	苗木生长		乙炔还原 活力 $\mu\text{mol}$ $\text{C}_2\text{H}_4$ / $\text{g} \cdot \text{鲜重} \cdot$ $\text{h}$	试验株数
					株高 (cm)	株重 (g)		
黄果沙枣 <i>E. oxycarpa</i>	膨化珍珠岩	Eoc 85	接菌	4—5	45	1.75	6.05	6
		Eoc 811	接菌	2—3	40	1.45	2.68	4
		对照	不接菌	0	28	1.0	0	5
沙 棘 <i>H. rhamnoides</i>	水	Hrc 97	接菌	9—11	53	5.2	0.63	3
		对照	不接菌	0	28	2.7	0	2
角花胡颓子 <i>E. gonyanthes</i>	水	Egc 107	接菌	3—8		4.5	3.53	10
		对照	不接菌	0		2.5	0	3
多花胡颓子 <i>E. multiflora</i> var. <i>ovata</i>	膨化珍珠岩	Emoc 1211	接菌	6—7	45	7.5	7.15	6
		对照	不接菌	0	34	6.1	0	3

注:表中数值以平均值计算;每个感染处长出的所有瘤瘤算一个瘤。

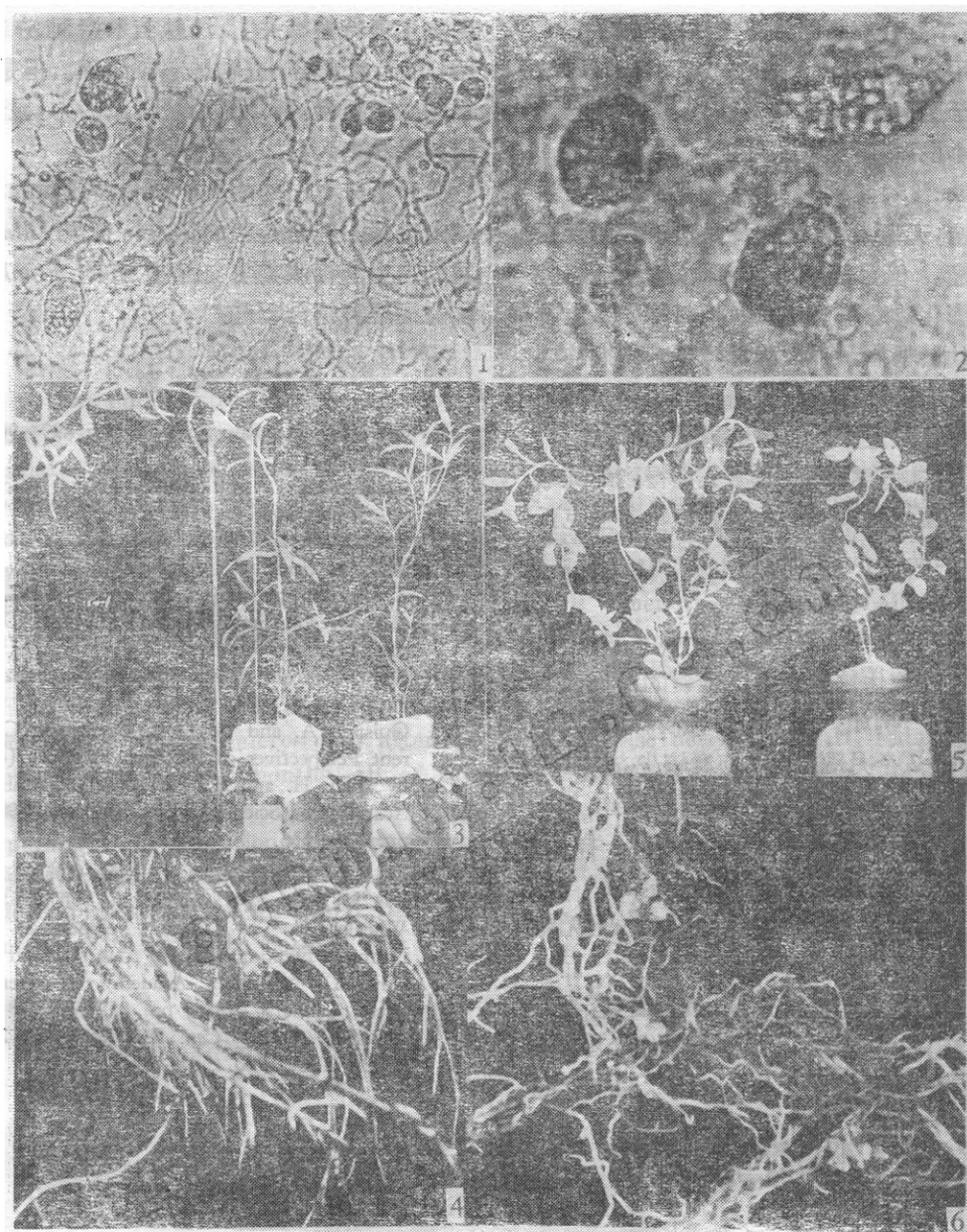


图 1 1. *Frankia* sp. Hrc 97 有柄的孢囊及孢囊壁破裂释放出孢囊孢子( $\times 520$ ); 2. *Frankia* sp. Emoc 1211 有柄的孢囊与不规则的圆形孢囊( $\times 660$ ); 3. 沙棘接种 *Frankia* sp. Hrc 97 感染结瘤株(左)与对照株(右)的生长情况; 4. 沙棘根系接菌感染形成的根瘤; 5. 黄果沙枣接种 *Frankia* sp. Eoc 811 感染结瘤株(左)与对照株(右)的生长情况; 6. 黄果沙枣根系接菌感染所结的根瘤。

Fig. 1 1. The sporangia with sporangiophores of *Frankia* sp. Hrc 97 and the spores released from a broken sporangium; 2. The sporangia with sporangiophore and the spherical and irregular sporangia of *Frankia* sp. Emoc 1211; 3. The growth of nodulated plant *Hippophae rhamnoides* (left) by infection of *Frankia* sp. Hrc 97 and of the control plant (right); 4. The nodules in the roots of *H. rhamnoides* after inoculation; 5. The growth of nodulated plant *E. oxycarpa* Schlecht. (left) by infection of *Frankia* sp. Eoc 811 and of the control plant (right); 6. The nodules in the roots of *E. oxycarpa* Schlacht. after inoculation.

## (二) 分离菌回接宿主试验结果

用分离菌 Hrc 97、Egc 107、Emoc 1211 回接至原宿主幼苗,培养四周观察,均已形成幼小根瘤,对照株未结瘤。

Eoc 85、Eoc 811 菌株回接于黄果沙枣幼苗,无氮水培 4—8 周,调查根系,无感染结瘤。但另一组幼苗接种分离菌后,栽培在膨化珍珠岩上,四周时,每株根系上都长出幼龄根瘤,不接菌对照株未结瘤。8 周后,调查感染结瘤与生长情况,同时测定根瘤的乙炔还原活力,结果见表 1 (图 1-3—6)。实验结果证明,所分离得到的纯培养菌是属有侵染性的共生固氮型弗兰克氏属 (*Frankia* spp.) 放线菌。

## 讨 论

1. 在液体培养基中,孢囊的形成因宿主而异。例如:黄果沙枣与沙棘内生菌,培养 1—2 个月观察,大孢囊较少,多是菌丝与膨大的菌丝体。多花胡颓子与角花胡颓子的内生菌则不同,与斜面培养一样,形成较多的大孢囊。

2. 黄果沙枣幼苗,接种分离菌,用无氮水培法,经二批试验均无感染结瘤。而在膨化珍珠岩上生长的幼苗,接菌后,容易感染结瘤。这可能是与胡颓子属的沙枣,能在干旱瘠薄土地上生长,不耐水湿条件的

生态生理特性有关。沙棘苗木接种分离菌,用无氮水培,成功地感染结瘤。但是,根瘤生长缓慢,所测得乙炔还原活力,显然较黄果沙枣为低。

3. 所分离出的胡颓子属和沙棘属的根瘤内生菌,纯培养菌的形态特征与 *Alnus* 属的内生菌相似,与文献报道的 *Frankia* 属的标准种符合<sup>[1,7,8]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Callahan, D. et al.: *Science*, 199: 899—902, 1978.
- [2] Guathier, D. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 306—308, 1981.
- [3] Lalond, M. and H. E. Calvert: *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests* (ed. by Gordon, J. C. et al.), Oregon State University Press, Oregon, 1979, pp 95—110.
- [4] Blom, J. et al.: *FEMS Microbiology Letters*, 9: 131—135, 1980.
- [5] Quispel, A. and A. J. P. Burggraaf: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*, (ed. by Alan, H. and E. Newton), Australian Academy of Science Press, Canberra, 1981, pp. 229—236.
- [6] E. J. 休伊特(崔激等译):《植物营养研究的砂培与水培法》,科学出版社,北京,91页,1965。
- [7] Wheeler, C. T.: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation* (ed. by Alan, H. and E. Newton), Australian Academy of Science Press, Canberra, 1981, pp. 252—256.
- [8] Baker, D. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 26: 1072—1089, 1980.

## ISOLATION AND REINOCULATION OF ENDOPHYTES OF *HIPPOPHAE RHAMNOIDES* AND *ELAEAGNUS*

Yang Huifan Jiang Jiande Huang Jiabing Zhu Baoqin

Zhung Yuhua Liu Huichang Yang Bifang Zhao Zhenying

(Institute of Forestry and Pedology, Academia Sinica, Shenyang)

The endophytes *Frankia* sp. Eoc 85 and *Frankia* sp. Eoc 811 were successfully isolated from root nodule of *Elaeagnus oxycarpa* Schlecht. The endophytes *Frankia* sp. Hrc 97 and *Frankia* sp. Hrc 922 were isolated from *Hippophae rhamnoides*. The endophytes *Frankia* sp. Emoc 1211 and *Frankia* sp. Egc 107 were isolated from *Elaeagnus multiflora* var. *ovata* and *Elaeagnus gonyanthes*. Under the light and scanning electron microscope, after cultivated for one-two months, all of them were identified as the Actinomycetes with sporangia. They belong to slow-growing type, without aerial mycelium, with well developed substrate mycelium, in liquid media growing in the bottom, and theref-

ore are microaerophilic. Sporangia are irregular, and there are a lot of immotile spores in them. Hyphae branched, septate, Gram-positive. These characteristics are similar to the *Frankia* spp. previously reported.

When the roots of seedlings of host plants were infected by Eoc 85, Eoc 811 Hrc 97, Emoc 1211 and Egc 107, the root nodules were formed on them. Their nitrogenase activities ( $C_2H_2$  reduction) are 6.05, 2.68, 0.63, 7.15 and 3.53 ( $C_2H_4$ ,  $\mu\text{mole/fr.g/h}$ ).

### Key words

*Hippophae rhamnoides*; *Elaeagnus*;  
*Frankia*