微 生 物 学 报　26 (4): 295—301, 1986
Acta Microbiologica Sinica

木麻黄根瘤共生放线菌——*Frankia* 的研究

李忠伟　　丁　鉴
(中国科学院林业土壤研究所，沈阳)

用根瘤切片培养法，从细枝木麻黄野生根瘤中分离出具有侵染能力的 *Frankia* sp. FSCc01 菌株。该菌株在多种常用放线菌培养基上生长缓慢，产生孢囊孢子，顶囊只在无氮培养基上大量出现。在一些培养基上，菌丝分化产生孢子囊状结构(SLS)。用纯培养物接种水培细枝木麻黄幼苗，2—4 周后即能形成典型的木麻黄根瘤，并表现出较强的乙炔还原能力。在较强的光照下，FSCc01 菌株的宿主结瘤早，瘤数量多，固氮能力强。能在 8.4ppm 的 NH_4^+ 态 N 存在下使宿主结瘤和固氮，pH 变化在 5.8—7.0 范围内对结瘤没有明显影响。对 FSCc01 菌株共生特性的进一步研究将有助于阐明其应用的可能。

关键词　弗兰克氏菌；细枝木麻黄；固氮

木麻黄(*Casuarina* spp.)与 *Frankia* 放线菌形成的根瘤共生体系，具有活跃的固氮能力，在改善生态环境、固沙造林及木材生产等方面具有重要价值。天然宿主种子上不携带 *Frankia* 放线菌，因此在新的地区造林时必须考虑接种问题。近几年来，由于 *Frankia* 放线菌分离的成功，为共生体系的改造和应用展示了广阔前景。Diem 等、Gauthier 等和 Zhang 等分别报道了从一些木麻黄树种的根瘤中分离到 *Frankia* 菌株[8,9,11,15]。杨慧凡等也报道了从木麻黄(*Casuarina equisetifolia* L.)根瘤中获得纯培养 *Frankia*[2]。然而，在这些菌株中仅少数能侵染原宿主，上述报告中均未详细报道结瘤条件。因此，分离具有侵染能力的 *Frankia* 菌株，深入探讨其结瘤条件，是十分必要的。

我们采用根瘤切片培养法，从细枝木麻黄(*C. cunninghamiana* Miq.)根瘤中分离到一株 *Frankia* 菌株，编号 FSCc01。对其形态培养特征、回接技术和条件，在水培宿主幼苗上形成有固氮活性的根瘤等进行了研究。并探讨了不同强度的光照、pH 及 NH_4^+ 态 N 存在下，对 FSCc01 菌株侵染能力的影响。

材 料 与 方 法

(一) 菌种的分离

细枝木麻黄(*Casuarina cunninghamiana* Miq.)一年生结瘤幼苗采自广州市苗圃，取新鲜瘤进行分离。

分离时，将根瘤外表洗净，分开瘤瓣，在 95% 乙醇中冲洗 10 秒钟，用酸性升汞($HgCl_2$ 0.1%，HCl 0.5%)表面灭菌 5 分钟，无菌水冲洗 5 次，再用少量的磷酸缓冲液(0.05*M*，pH 7.2)加 0.1% PVP-40 (polyvinyl pyrrolidone) 浸泡，并在无菌操作下将瘤瓣切成小块，转移到盛有 M6B 液体培养基[3](含 0.1% PVP-40)的试管中。试管放入 28℃ 恒温箱中培养，一周后将棉塞换成胶塞。FSCc01 菌株在接种后 4 个月从瘤块切面长出。

(二) 离体培养及显微形态观察

常规培养和菌种保存使用 BAP 和 B 培养基[14]。此外，在其他 12 种培养基上进行培养并观察生长情况，这些培养基是 Tween/Cas[5]，B/2，

本文于 1985 年 4 月 9 日收到。
扫描电镜形态观察承毕庶春、王丽霞同志协助；胡连生同志帮助测定乙炔还原活性，在此一并致谢。

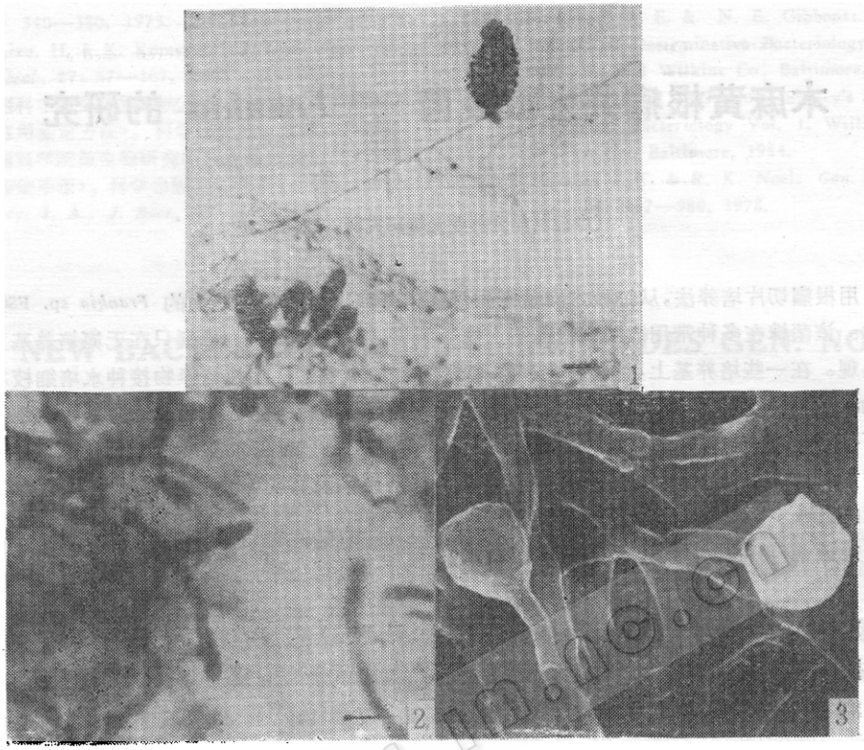

图 1 FSCc01 菌株的显微形态

1. 侧生孢子囊，顶囊和菌丝(粗线示 10 μm); 2. SLS 结构 (粗线示 10μm);
3. 顶囊(扫描电镜照片，×5000)。

Fig. 1 Microscopic observations of *Frankia* sp. FSCc01

1. lateral sporangia, vesicles and hyphae (bar = 10μm); 2. sporangia-like structure (bar = 10μm); 3. vesicles.

GuA, GyA, OAT, FRB, Ycz, NTW, SXT, YM, STR, TAP[4]。每种培养基包括液体和固体斜面，接种后在 28℃恒温培养，每隔一周观察结果。显微形态观察使用光学显微镜 (Olympus BH-2) 及扫描电子显微镜 (JEM 100-B)。

（三） 幼苗培养

细枝木麻黄种子采自广州市苗圃。先将种子用酸性升汞浸泡 10 分钟进行表面消毒，然后播种到灭过菌的珍珠岩中，用稀释 4 倍的 Hoagland 营养液[15]和水轮换浇灌(水和营养液均先经煮沸消毒)。幼苗发育期间，采用白炽灯与日光灯混合照明，光强为 6,000—8,000 lux，每天照明时间 14—16 小时；温度白天为 22—28℃，夜间 16—22℃。幼苗长至 5cm 左右时，转移到 125ml 广口瓶中，用稀释 4 倍的 Hoagland 营养液水培，待在水培中长出有根毛的新根后进行接种。

（四） 结瘤试验

无菌操作将纯培养菌体制成菌悬液，浸泡苗根部 15—30 分钟，小苗放入稀释 4 倍的无 NH_4^+ Hoagland 营养液中培养，并观察结瘤情况。

回接时，对该菌株在不同条件下的侵染能力，包括 3 种光照强度、培养液中不同浓度的 NH_4^+ 态 N 及不同 pH 等进行了比较试验。

根瘤固氮活性采用乙炔还原法测定[14]。

结 果

（一） 形态和培养特征

FSCc01 菌株在 BAP 培养基上生长最好。接种后一个月，形成大量菠萝形、棒状

表 1　FSCc01 菌株在各种培养基上的生长特征

Table 1　Cultural characteristics of *Frankia* sp. FSCc01 in different media

培养基 Medium	生长 Growth		孢子囊 Sporangium	顶　囊 Vesicle	SLS	水溶性色素 Water-Soluble pigment
	液　体 Liquid	固　体 Agar slants				
BAP	+++		+	−	−	淡黄
B	+++		+	+	−	,,
Tween/Cas	+	−	+	−	−	无
B/2	+	+	+	−	−	,,
GuA	+/−	+/−	+	+	−	,,
GyA	+/−	−	+	+	−	,,
OAT	+/−	+/−	+	−	+	,,
FRB	+	−	+	−	+	,,
Ycz	+/−	+/−	+	+	+	,,
NTW	−	−				,,
SXT	−	−				,,
YM	+/−	−				,,
STR	−	−				,,
TAP	−	−				,,

注：接种后 6 周观察的结果。相对生长量：+++旺盛；+较缓慢；+/−稍有生长；−不长。

Observed 6 weeks after inoculation. Relative growth: +++ excellent; + slow; +/− rare; − no growth.

和一些不规则形状的孢子囊。孢子囊多在菌丝侧向发生，偶尔可见到端生和间生。在不含化合态氮素的 B 培养基上生长旺盛，同时形成大量顶囊（vesicles），并具有乙炔还原活性。在 B 培养基上，FSCc01 菌株的菌丝直径为 0.4—1.3μm，成熟的孢子囊可达 30—40μm，内含 1.7—3.0 μm 的多角形孢子，顶囊直径为 2.2—4.1μm，其柄长为 2.8—18.2μm（见图 1）。

在其他 12 种培养基上，FSCc01 菌株生长较慢或不生长（见表 1）。值得注意的是在一些培养基中，菌丝可分化为大量短而粗且内有细密分隔的结构。这与 Diem 等描述过的孢子囊状结构（sporangia-like structure, SLS）极为相似[10]。此外，FSCc01 菌株容易在液体培养基上生长。

（二）　侵染宿主和结瘤

经过多次回接，FSCc01 菌株均能侵染水培宿主幼苗产生根瘤。用 B 培养基上培养 20 天和 70 天的菌体分别接种，都能结瘤。

幼瘤一般在接种后 2—4 周在新根上出现，初为白色突起，数日内可发育成膨大的瘤瓣（nodule-lobes），同时瘤瓣顶端长出白色的瘤根（nodule-roots）。瘤根呈离地生长（negative-geotropism），不分叉，无根毛，随着瘤的生长而伸长，可达 5cm。瘤瓣形成后，在其基部可重复地发生新的突起形成新的瘤瓣，并长出新的瘤根，最终瘤瓣丛聚在一起长成成熟的根瘤（见图 2-1）。

在相同的条件下，所有的不接种对照幼苗均未产生根瘤，并且生长不良（见图 2-2）。

（三）在不同环境条件下 FSCc01 菌株对宿主的侵染力和固氮活力

在不同的光照强度下，结瘤和固氮呈现出十分明显的规律性（见表 2）。10,000 lux 碘钨灯光照下根瘤出现早，瘤数量多且生长快，固氮活力强。在仅 4,000 lux 日光

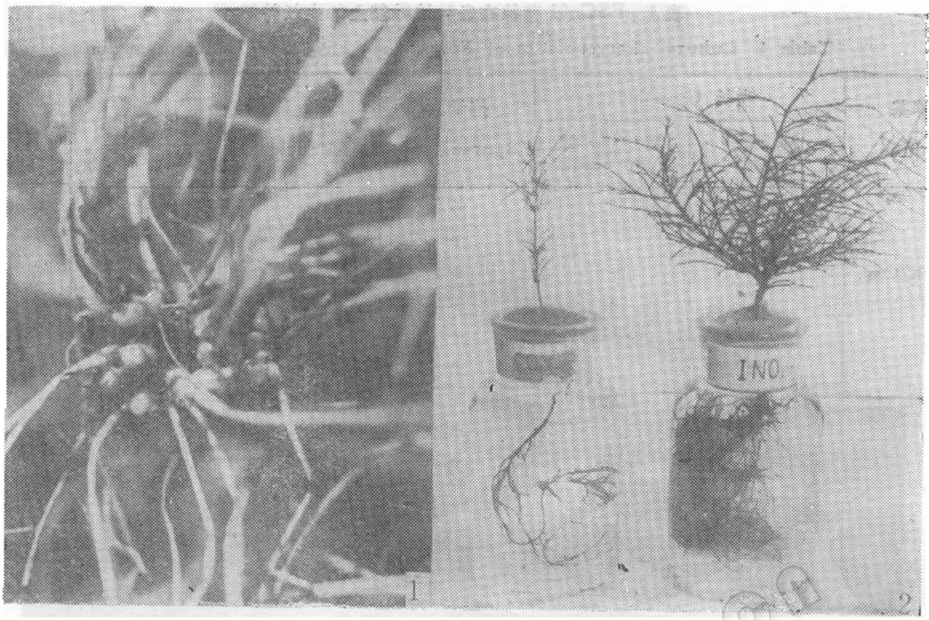

图 2　细枝木麻黄幼苗结瘤情况

1. FSCc01 菌株回接产生的根瘤（×4）；2.水培幼苗：INO.——接种并结瘤；CON.——不接种对照，无瘤。

Fig. 2　Nodulation of *C. cunninghamiana* seedlings

1. nodules induced by *Frankia* sp. FSCc01; 2. water-cultured seedlings: INO.——inoculated with FSCc01, nodules formed on root system; CON.——control, without nodule.

表 2　不同光照强度对结瘤和固氮的影响

Table 2　The effect of illumination intensity on nodulation and nitrogen fixation

光照强度 Illumination intensity (lux)	接种后幼瘤发生的时间(天) Nodule appearance after inoculation (day)	5 周后结瘤情况 Nodulation in 5 weeks		固氮酶活性 (μmol C_2H_4/h·g·鲜重) Nitrogenase activity (μ mol C_2H_4/h·g·fr.)
		株　数 Seedlings nodulated	瘤个数 Total No. of nodules	
10,000（碘钨灯）(Iodized tungsten lamp)	14	7	66	9.35
7,000（碘钨灯）(Iodized tungsten lamp)	15	6	13	0.30
4,000（日光灯）(Fluorescent tubes)	22	3	3	未测出

注：培养液pH 6.3，各种处理均为 7 株。不接种对照（7,000 lux，碘钨灯）未结瘤。
pH 6.3, 7 seedlings for every group. Uninoculated controls (7,000 lux, iodized tungsten lamp) were not nodulated.

灯照下，苗生长极慢，但 FSCc01 菌株仍能侵染宿主并结瘤。

培养液含 8.4 ppm 的 NH_4^+ 态N时，FSCc01 菌株能使宿主结瘤，并表现出一定的固氮能力。更高浓度的 NH_4^+ 态N抑制结瘤、小苗根端膨大、无根毛(表 3)。

表 3　NH_4^+ 态 N 对结瘤的影响

Table 3 The effect of ammonium-N on nodulation

NH_4^+ 态N Ammonium-N (ppm)	试验苗(株) No. of tested seedlings	结瘤株数 No. of nodulated seedlings	固氮酶活性 (μ mol C_2H_4/h · g · 鲜重) Nitrogenase activity (μ mol C_2H_4/h · g · fr.)
8.4	5	4	2.72
16.8	5	0	—
33.6	5	0	—

注：培养液 pH 6.3，光照(日光灯加白炽灯) 8,000lux. 不接种对照 10 株苗(无 NH_4^+ 培养)未结瘤。
pH6.3, illumination (fluorescent tubes + incandescent bulbs) 8,000 lux. Uninoculated controls (10, without NH_4^+) were not nodulated.

表 4　不同 pH 条件下的结瘤情况

Table 4 Nodulation trial under different pH level

培养液 pH Nutrient solution pH	试验苗(株) No. of tested seedlings	结瘤株数 No. of nodulated seedlings	结瘤率 (%) Percentage of nodulated seedlings
5.8	8	5	62
6.3	8	5	62
7.0	8	4	50

注：光照(日光灯加白炽灯) 6,000 lux，不接种对照 6 株 (pH 6.3) 未结瘤。
Illumination (fluorescent tubes + incandescent bulbs) 6,000 lux. Uninoculated controls (6, pH 6.3) were not nodulated.

培养液 pH 值的变化对结瘤未产生明显的影响(表 4)。在这个 pH 范围内，培养液不产生沉淀或其他可见的反应。

讨　　论

据报道，17 个来自木麻黄的 *Frankia* 菌株中，只有 4 株能侵染原宿主[2,8,15]。其余除几株能侵染胡颓子科植物外，没有发现具有侵染能力。出现这种情况的原因尚不清楚。我们认为，分离所采用的根瘤的来源可能影响菌株的侵染能力。因为，大多数从木麻黄分离 *Frankia* 的工作都是先用野生根瘤匀浆接种实验室培养的幼苗，然后再取新鲜根瘤进行分离。这样处理有一定不足之处。首先，结瘤过程中可能受到实验室其他来源的 *Frankia* 的污染，分离到的菌株是否来自原宿主存在疑问。其次，*Frankia* 经过根瘤内生活，有可能受到植物选择或发生变异而影响其侵染能力。因此，我们认为直接从野生根瘤分离或许是必要的，这样还可使分离过程简单易行。

我们在试验了酶处理、蔗糖梯度离心及根瘤切片培养等方法的基础上，采用了切片法，并经改进进行分离。这种方法表面灭菌效果良好，通过从各种非豆科树木的野生根瘤中分离 *Frankia* 菌株，证明是一种简便而有效的分离方法。

杨慧凡等认为，采用水培幼苗回接可能不利于 *Frankia* 侵染，接种 3 个月后仍不结瘤；当转移到珍珠岩中培养并再次接种，2 个月后才结瘤，但结瘤率很低。而我们采用水培技术在木麻黄上则得到了很好的结瘤效果，证实水培技术是鉴定菌株侵染能力的有效方法。水培不仅能使 FSCc01 菌株侵染宿主，而且具有易于控制条件、便于观察结瘤等优点。FSCc01 菌株接种

后，根瘤在 2—5 周便可出现。而一般认为，产生根瘤的时间过长则难以确证是接种的结果。我们认为，宿主幼苗的生理状态是结瘤成败的关键。强光照下幼苗健康，根系发达，生长较快，充足的光合产物无疑也有利于 *Frankia* 的侵染和根瘤的发育。另外，根瘤是在接种时的根毛区发生，因此接种时幼苗在水培中是否已长出根毛丰富的新根，是很重要的。强光照和通气有利于根毛的形成。高浓度的 NH_4^+ 态N如何抑制结瘤尚不清楚，但幼苗根端膨大，根毛消失，这一点值得注意。

水培幼苗结瘤试验的结果表明，FSCc01 菌株结瘤和固氮具有耐受 8.4ppm NH_4^+ 态N的能力，在一定的 pH 范围内结瘤不受影响，而 4,000lux 日光灯光照也不能完全抑制结瘤。这说明 FSCc01 具有一定的生态适应能力，可能有利于在较肥沃的土壤及不良的环境条件下与宿主建立共生关系，因此 FSCc01 具有应用的潜力。在天然土壤中，情况比较复杂，不仅物理、化学性质有很大差异，还存在着其他微生物和动植物的影响，特别是可能遇到当地 *Frankia* 的竞争。水培条件下侵染能力的研究，为不同生态条件下建立共生提供了线索，进一步在天然土壤中采用不同条件研究其侵染宿主和共生固氮能力，将有可能发现 FSCc01 菌株的实用价值。

参 考 文 献

[1] 丁鉴：微生物学杂志，4(2)：41—45，1984。
[2] 杨慧凡等：生态学杂志，4：59—61，1984。
[3] Baker, D. and J. G. Torrey: Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests (ed. J. C. Gordon et al.), Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis, OR, pp. 38—56, 1979.
[4] Baker, D. and J. G. Torrey: *Can. J. Microbiol.*, 26: 1072—1089, 1980.
[5] Blom, J. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 9: 131—135, 1980.
[6] Bond, G. and C. T. Wheeler: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation (ed. F. J. Bergersen), John Wiley & Sons, pp. 185—211, 1980.
[7] Burgraaf, A. J. P. and J. Valstar: *Plant and Soil*, 78: 29—44, 1984.
[8] Diem, H. G. and Y. R. Dommergues: *Can. J. Bot.*, 61: 2822—2825, 1983.
[9] Diem, H. G. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 28: 526—530, 1982.
[10] ——————: *Can. J. Bot.*, 61: 2815—2821, 1983.
[11] Gauthier, D. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 306—308, 1981.
[12] Lalonde, M. et al.: Current Perspectives in Nitrogen Fixation (ed. A. H. Gibson and W. E. Newton), Australian Academy of Science, Canberra, pp. 296—299, 1981.
[13] Murry, M. A. et al.: *Plant and Soil*, 78: 61—78, 1984.
[14] Zhang, Z. and J. G. Torrey: *Annals of Botany*, 56: 367—378, 1985.
[15] Zhang, Z. et al.: *Plant and Soil*, 78: 79—90, 1984.

ISOLATION OF *FRANKIA* SP. FSCc01 FROM ROOT NODULES OF *CASUARINA CUNNINGHAMISNA* AND ITS CULTIVATION IN VITRO AND NODULATION CONDITIONS

Li Zhongwei　Ding Jian

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

An infective strain of *Frankia* (designated FSCc01) was isolated from root nodules of *Casuarina cunninghamiana* Miq. by nodule-piece method. Growth of FSCs01 was excellent in BAP and B medium, but very poor in most other media tested. FSCc01 can form abundant sporangia and vesicles in BAP medium lacking combined nitrogen. In addition, it can also form an uncommon sporangia-like structure (SLS) in some media. When the pure culture of FSCc01 was inoculated to the root system of water-cultured *C. cunninghamiana* seedlings, typical *Casuarina* nodules with negative-geotrophic growing nodule-roots were formed after 2—4 weeks. The nodules showed active acetylene reduction. Nodulation, nitrogen fixation and growth of host seedlings were better at 10,000 lux illumination than at 7,000 lux. The poorest results were obtained at 4,000 lux. Host seedlings were well nodulated with FSCc01 in the presence of 8.4 ppm ammonium-N, and showed N_2-fixing activity. No distinct difference in nodulation was observed within pH range of 5.8—7.0. This may imply a way towards its application for forest growing.

Key words

Frankia; Casuarina cunninghamiana; Nitrogen fixation