

蔓胡颓子根瘤内生菌的分离和培养

袁长芳 周鸿宾 郝家骥 龚彬

(山西省生物研究所, 太原)

用四氧化钨法, 从蔓胡颓子 (*Elaeagnus glabra* Thunb) 根瘤中分离出内生菌纯培养菌株 (*Frankia* sp. EgI413)。根据其形态特征, 确认为孢囊放线菌。该菌株的菌丝、孢囊、孢囊孢子和孢囊基本与已知胡颓子属植物根瘤内生菌株相似, 回接宿主植物实生苗, 形成大量具有固氮活力的根瘤, 根瘤的固氮酶活力为 $21.5 \text{ n mol C}_2\text{H}_4/\text{g}$ 根瘤鲜重·分钟。该菌株最适宜的碳源为挥发性的脂肪酸(如丙酸), 最适宜的氮源为多蛋白陈, 在基础培养液中加入维生素混合物, 对生长有抑制作用。最适培养温度为 29°C , 最适生长的 pH 范围 6.5—7.0。

关键词 弗兰克氏菌; 蔓胡颓子; 内生菌

目前, 非豆科根瘤内生菌的分离方法已有多种, 其中有酶解法^[1]、系列稀释法、选择培养法和四氧化钨法^[2]。四氧化钨法最早开始于 Lalonde^[3]等人, 用于处理 *Alnus glutinosa* 根瘤并获得纯培养。后来, Normand^[2]等人用该方法从 *Alnus crispa* 和 *A. rugosa* 根瘤中获得纯培养。尚未见用该方法在其它结瘤植物中获得成功的报道。

作者用四氧化钨法, 处理蔓胡颓子的根瘤, 迅速成功地获得了纯培养菌株, 对其典型菌株 (*Frankia* sp. EgI413) 的形态学和培养条件作了研究。

材料与方法

(一) 根瘤来源

1983年11月采自江西庐山的蔓胡颓子 (*Elaeagnus glabra* Thunb.)。

(二) 培养液

1. 分离用培养液为 QMod^[4]。

2. 培养条件试验用培养液, 基础培养液 (BCM) 组成 (g/L): K_2HPO_4 0.3, NaH_2PO_4 0.2, KCl 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0.2, CaCO_3 0.1, 柠檬酸铁和微量元素^[4], 生物素 0.002, pH 6.8, 碳、氮

源根据试验要求加入。

(三) 内生菌的分离和观察

1. 分离方法参照 Normand^[2] 的根瘤处理程序进行。唯一区别, 在于接种时用镊子将根瘤突夹成两半, 而不是研碎根瘤接种试管。

2. 电镜制片参照 Newcomb^[5] 等人的方法。

(四) 菌体蛋白定量测定

用 Lowry^[6] 等人的方法。

结果与讨论

(一) EgI413 菌株的形态特征

从蔓胡颓子分离的 EgI413 菌株与杨慧凡^[8]从多花胡颓子和角花胡颓子中所分离的菌株相似, 可能由于培养方式和培养液不同, 其形态特征有些差异。

在 QMod 培养液中培养, 最初菌丝体为白色, 20 天后则培养液变橙色, 菌落为橙皮黄色。菌丝极曲折, 中间生有大量的球形膨大物, 直径 $3 \mu\text{m}$ 左右, 类似幼龄孢囊, 由于数量大, 不可能都发育成大的孢囊 (图 1-4)。孢囊在菌丝顶端或中间形成, 较其它菌株数量大, 但个体小, $5-10 \mu\text{m}$ 左右

本文于 1984 年 11 月 27 日收到。

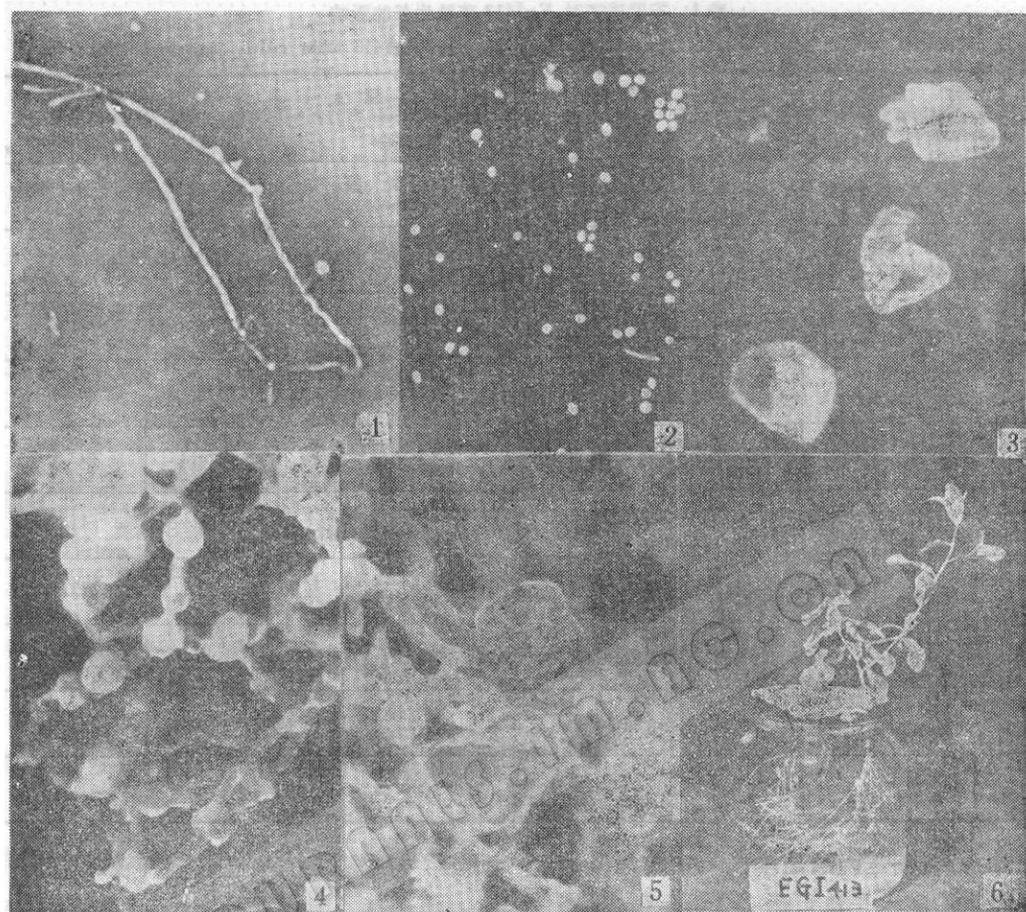


图1 弗兰克氏菌 EgI 413 菌株

Fig. 1 *Frankia* sp. EgI413

1. 泡囊($\times 1,000$); 2. 孢子($\times 1,000$); 3. 孢子的扫描电镜照片($\times 15,000$); 4. 菌丝和幼龄孢囊($\times 6,000$); 5. 近于成熟的孢囊($\times 7,000$); 6. 回接后结瘤的实生苗。

1. Vesicle; 2. Spores; 3. Scanning electron micrograph of spores; 4. Hyphae and young sporangia; 5. A nearly mature sporangia; 6. Nodulated seedling after inoculation.

(图1-5), 孢囊成熟则释放大量孢子, 孢子呈不规则多面体, 表面富有褶皱, 直径1— $1.5\mu\text{m}$ (图1-2,3)。在 QMod 中可见到少数孢囊 (图1-1)。

用菌体回接宿主无菌实生苗根部, 形成大量的根瘤, 其根瘤的固氮活力(乙炔还原)可达 $21.5\text{n mol C}_2\text{H}_4/\text{g}$ 根瘤鲜重 \cdot 分钟。

将菌体接入无氮限定培养液中, 可诱导产生多数孢囊, 纯培养菌的固氮酶活力(乙炔还原)可达 $18.05\text{n mol C}_2\text{H}_4/15\text{ml}$ 培

养液 \cdot 天。

(二) 碳源试验

用基础培养液, 加 NH_4Cl 0.1g/L , 碳源按表1加入, 接种后静止培养, 29°C , 周期14天, 结果见表1。

该菌株不仅酵解单糖(如葡萄糖及其酸盐), 而且能酵解二糖(如蔗糖和麦芽糖), 但不酵解可溶性淀粉。微利用甘露糖、鼠李糖或半乳糖。三羧酸循环中的酸类(如苹果酸、琥珀酸、 α -酮戊二酸)也可以作为碳源, 挥发性的酸(如丙酸和醋酸)也

表 1 不同碳源对 Eg1413 菌株生长的影响

Table 1 Effect of various carbon sources on growth of Eg1413 after cultivation for 14 days

碳 源 Carbon source	浓度 (g/L) Concentration	菌体蛋白量 Cell protein (μg/15ml)	碳 源 Carbon source	浓度 (g/L) Concentration	菌体蛋白量 Cell protein (μg/15ml)
蔗 糖 Sucrose	10.0	25.8	山 梨 糖 Sorbitose	3.0	<1
麦 芽 糖 Maltose	10.0	40.0	苹 果 酸 Malate	1.0	21.5
乳 糖 Lactose	5.0	<1	柠 檬 酸 Citric acid	1.0	<1
可溶性淀粉 Soluble starch	1.0	<1	α-酮戊二酸 α-Keto- glutaric acid	1.0	25.8
葡 萄 糖 Glucose	10.0	125.0	丙 酸 Propionic acid	0.5ml	292.0
半 乳 糖 D-Galactose	5.0	13.3	醋 酸 钠 Na-Acetate	0.5	41.7
甘 露 糖 D-Mannose	5.0	5.0	琥 珀 酸 钠 Na-Succinate	1.0	41.7
木 糖 D-Xylose	5.0	<1	吐 温-80 Tween-80	1.0	104.2
鼠 李 糖 L-Rhamnose	5.0	13.3	无 碳 源 Nil carbon source	0	<1
葡萄糖酸钠 Na-Gluconic acid	5.0	50.8			

能利用。特别是丙酸是本试验中的最佳碳源,菌体最高生长量可达 292.0μg 蛋白/15 ml 培养液。吐温-80 也是一种较好碳源。该菌株不能酵解乳糖、可溶性淀粉、木

表 2 不同氮源对 Eg1413 菌株生长的影响

Table 2 Effect of various nitrogen source on growth of Eg1413 strain after cultivation for 14 days

氮 源 Nitrogen source	浓度(g/L) Concentration	菌体蛋白量 Cell protein (μg/15ml)	氮 源 Nitrogen source	浓度 (g/L) Concentration	菌体蛋白量 Cell protein (μg/15ml)
NH ₄ Cl	0.1	31.7	多 蛋 白 胨 Polypepton	5.0	150.0
NH ₄ NO ₃	0.1	23.3	牛 肉 膏 Beef extract	5.0	4.2
NH ₄ Ac	0.1	14.2	酵 母 膏 Yeast extract	5.0	26.0
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1	21.7	酪 素 Casein	1.0	48.3
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.1	25.0	酪蛋白水解物 Casamino acid	1.0	56.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1	47.5	谷 氨 酸 Glutamic acid	1.0	<1
			无 氮 源 Nil nitrogen source	0	22.5

糖、山梨糖、柠檬酸。

(三) 氮源试验

用基础培养基，碳源为丙酸 0.5 ml/L，氮源如表 2，培养液 pH 6.8，29℃ 静止培养 14 天，结果如表 2。

表 2 说明，该菌株能利用 NH_4^+ 作为氮源，其中以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 较好，可以利用酪素和酵母膏。酪蛋白水解物作氮源时，生长良好。最佳氮源为多蛋白胨(日本，大五荣养化学株式会社)。多蛋白胨与 NH_4Cl 相

比，菌体生长量提高了 4 倍。在无氮源的培养液中生长良好，说明基础培养液是良好的诱导固氮酶活力的系统，丙酸为提供固氮酶能源的良好碳源。

(四) 微量元素和维生素对生长的影响

基础培养液，碳源为丙酸 0.5 ml/L，氮源为 NH_4Cl 0.1 g/L。混合维生素组成按 Blom^[7] 的成分母液。按表 3 逐一增加基础培养液的成分，生长情况见表 3。

表 3 微量元素和维生素对 Eg1413 菌株生长的影响

Table 3 Effect of trace elements and vitamins on growth of Eg1413 strain after cultivation for 15 days

碳 源 Carbon source	氮 源 Nitrogen source	柠檬酸铁 Fe-citrate	微量元素 Trace element	混合维生素 Vitamins	生物素 Biotin	菌体蛋白量 Cell protein ($\mu\text{g}/15\text{ml}$)
丙 酸 Propionic acid	NH_4Cl	-	-	-	-	27.5
+	+	+	-	-	-	8.3
+	+	+	+	-	-	16.6
+	+	+	+	+	-	10.0
+	+	+	+	-	+	54.2

注：“+”为加入成份，“-”为不加成份。

在基础培养液中，加入柠檬酸铁、混合维生素或微量元素，对生长有抑制作用，

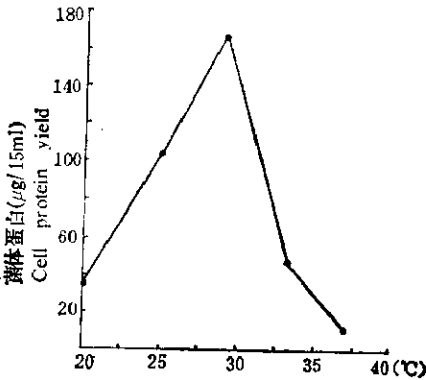


图 2 温度对 Eg1413 菌株生长的影响

Fig. 2 Effect of temperature on growth of strain Eg1413

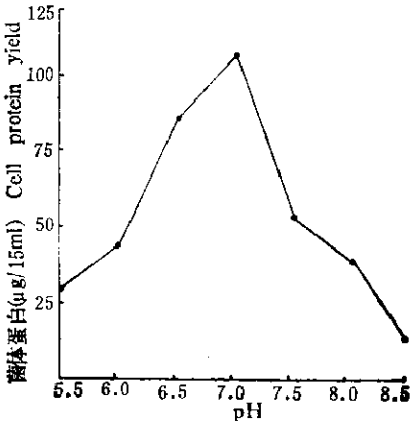


图 3 pH 对 Eg1413 菌株生长的影响

Fig. 3 Effect of pH on growth of strain Eg1413

由于微量元素和混合维生素是多种成份,所以尚能不确定起抑制作用的主要是哪一种物质。但生物素对生长起促进作用。

(五) 不同温度对生长的影响

用 TB^[9] 培养液,接种后置不同温度下,培养 20 天后,测菌体生长量,结果如图 2。

图 2 表明,在 20、37℃ 生长微弱,25—33℃ 生长良好,最适宜生长的温度为 29℃。

(六) pH 对生长的影响

将 TB 培养液 pH 调至 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5,接种与培养条件一致,29℃ 培养 20 天,菌体生长结果见图 3。

图 3 说明,该菌株生长所能适应的 pH 范围较宽,5.5—8.0 均能生长,而最适宜 pH 为 6.5—7.0。

参 考 文 献

- [1] Callaham, D. et al.: *Science*, 199: 899—902, 1978.
- [2] Normand, P. and M. Lalonde: *Can. J. Microbiol.*, 28: 1133—1142, 1982.
- [3] Lalonde, M. et al.: In *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*, (eds. A. H. Gibson and W. E. Newton), Australian Academy of Science, Canberra, pp. 296—299, 1981.
- [4] Lalonde, M. et al.: In *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate*, Oregon State University Press, Oregon, pp. 95—110, 1979.
- [5] Newcomb, W. et al.: *Bot. Gaz.*, 140(Suppl.): 22—24, 1979.
- [6] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 13: 265—275, 1951.
- [7] Blom, J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 13: 51—55, 1982.
- [8] 杨慧凡等: *微生物学报*, 24(4): 315—319, 1984.
- [9] Burggraaf, A. J. P. and W. A. Shipton: *Plant and Soil*, 69: 135—147, 1982.

ISOLATION AND CULTIVATION OF ENDOPHYTE FROM NODULES OF *ELAEOAGNUS GLABRA*

Yuan Changfang Zhou Hungbin Hao Jiaqi Gung Bin

(Shanxi Institute of Biology, Taiyuan)

Using the treatment method, an actinomycetous endophyte, *Frankia* sp. EgI413 were isolated as pure culture from nodules of *Elaeagnus glabra*. The morphology of this strain was observed by light microscope and scanning electron microscope. the characteristics of hyphae, sporangia, spores and vesicles are similar to that of *Frankia* sp. of *Elaeagnus* as previously reported. When the root of sterile seeding of host plant were inoculated by pure culture of EgI413 strain, the root nodules were formed. The nitrogenase activity of these nodules (C_2H_2 reduction) is 21.5 n mol H_2 /fr·g/min. Carbon and nitrogen

source requirement, the effect of vitamins and trace elements on growth, the optimum pH and temperature were studied. The optimum carbon is volatile fatty acid, such as propionic acid. The optimum nitrogen source is polypepton. The addition of vitamins in cultural solution inhibited its growth. The optimum temperature for growth is 29°C. The range of pH for growth between 6.5 and 7.0.

Key words

Frankia; *Elaeagnus glabra*; Endophyte