

Frankia 菌种保藏

苏凤岩 张忠泽 李维光 王玉英 丁 鉴

(中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110015)

摘要 对用4种方法保藏的 *Frankia* 菌,进行了培养物存活、形态及其固氮活性的检测。发现在无氮液体培养基中保藏6年的 *Frankia* 菌丝断裂,孢囊不完整。同期经有氮液体保藏的 *Frankia* 菌孢囊较完整。冷冻干燥保藏3.5年和砂管保藏8年,孢囊和菌丝均较完整。上述方法保藏的菌种,经活化后均能生长,且具有典型的 *Frankia* 菌形态特征和固氮活性。4种方法比较,无氮液体保藏法的菌体细胞生长速度快,固氮活性强,有侵染结瘤能力。

关键词 *Frankia*, 保藏, 形态

自1978年 *Frankia* 菌被分离得到纯培养物以来,国内外研究者陆续从不同非豆科树种分离得到大量 *Frankia* 菌。我国已从5个属34个非豆科固氮树种上分出 *Frankia* 纯培养物^[1],使 *Frankia* 菌研究有了很大进展,其菌种保藏方法也成了探讨的课题^[2]。作者根据降低微生物新陈代谢速率,使生命活动处于半永久性的休眠状态,不发生和少发生变异的原理^[3],设计了4种保藏方法,研究它对 *Frankia* 菌的影响,结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

供试菌株来源见表1。

表1 供试菌株

Table 1 *Frankia* strains tested in the experiment

菌株 Strain	寄主植物 Host plant	来源 Geographical origin
At4	色赤杨 <i>Alnus tinctoria</i>	中国辽宁 Liaoning China
Aph1	毛赤杨 <i>A. hirsuta</i>	中国长白山 Mountain Changbai China
As2-8	西伯利亚赤杨 <i>A. sibirica</i>	中国黑龙江 Heilongjiang China
CPI1	香蕨木 <i>Comptania peregrina</i>	美国麻省 Mass. USA.
CcO1	木麻黄 <i>Casuarina cunnunghamiana</i>	中国广东 Guangdong China
Hr18	沙棘 <i>Hippophae rhamnoides</i>	中国辽宁 Liaoning China
Mn35	矮杨梅 <i>Myrica nana</i> Cheval	中国云南 Yunnan China
Mg+	香杨梅 <i>Myrica gale</i>	美国麻省 Mass. USA.

本文于1992年9月8日收到。

1.2 供试培养基

1.2.1 BAP 培养基: 见参考文献[4]。

1.2.2 有氮、无氮液体培养基(g/L): KH_2PO_4 0.9; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COONa}$ 0.48(或 CH_3COONa 1.1); NH_4Cl 0.53(无氮液体培养基将 NH_4Cl 去掉)。

1.3 保藏方法

1.3.1 有氮液体: 将供试菌培养在 BAP 培养基中, 14 天后转移到含有 15 毫升有氮液体培养基试管中一周, 然后用灭菌胶塞将管口塞上, 放于室温暗处保藏。

1.3.2 无氮液体: 方法同上, 只是在保藏中未加 NH_4Cl 。

1.3.3 冷冻干燥: 见参考文献[5]。

1.3.4 砂管: 在 BAP 培养基中培养 14 天的菌, 按常规砂管方法保藏^[6]。

1.4 测定方法

1.4.1 菌体蛋白测定: 见参考文献[7]。

1.4.2 固氮活性测定: 将保藏的菌种以有氮 BAP 培养基活化后, 转移到无氮液体 BAP 培养基中诱导 7 天, 离心收集一定量菌体装入育霉素瓶中, 用无菌胶塞封口, 注入一定量的乙炔气, 同时取出和乙炔注入量相同的气体, 28℃ 下振荡反应 1 小时, 于国产 100 型气相色谱仪上测定乙烯。

1.5 回接感染试验

以分离自沙棘和木麻黄的 *Frankia* 为代表, 对有氮和无氮液体保藏的菌种进行回接试验。

1.5.1 苗木培养: 选饱满的沙棘和木麻黄种子, 以 0.1% HgCl_2 表面灭菌 10 分钟, 无菌水洗涤数次, 播种在灭菌沙盆中, 待出芽后, 以含氮 1/5 强度的 Hoagland 营养液浇灌, 长 2—5 片叶时, 转入无氮 Hoagland 水培液中备用。

1.5.2 *Frankia* 菌种制备和回接: 将保藏多年的 Hr18 和 Cc01, 在有氮培养基中活化半月, 转移到无氮液体 BAP 培养基中 20 天左右, 收集菌体, 制成菌悬液用于回接在菌体上。回接方法有两种, 试管法^[8]和广口瓶法^[9]。

2 结果和讨论

2.1 形态

2.1.1 无氮液体保藏 6 年的 *Frankia* 菌孢囊和菌丝破裂。

2.1.2 有氮保藏 6 年的 *Frankia* 菌孢囊和菌丝部分破裂和断裂。

2.1.3 冷冻干燥保藏 3.5 年, 菌丝及孢囊均较完整。

2.1.4 砂管保藏 8 年 *Frankia* 菌丝、孢囊也保持较完整。

以上 4 种方法保藏的菌, 经过活化, 菌仍然存活, 表现在活化过程中菌体蛋白的增加, 其中无氮液体保藏的菌体蛋白增加快(表 2), 均具有典型的 *Frankia* 菌形态特征^[10]。

表2 不同保藏方法对 *Frankia* 生长量的影响

Table 2 The effect of different preservation methods for protein

菌种 Strain	生长量($\mu\text{g/ml}$) Protein				t 检验 LSD5%
	无氮液体(6年) Nitrogen-free Liquid (6 years)	有氮液体(6年) Nitrogen liquid (6 years)	冷冻干燥(3.5年) Lyophilized milk (3.5 years)	砂管(8年) Sterile sand (8 years)	
At4	15.37b	21.40 a	2.80 c		0.47
Aph1	2.67 b	2.03 c	5.43a		0.24
As2-8	3.30 c	4.41 b	4.38 a		0.17
Cc01	7.20 a	7.10 a	7.50 a		0.68
Hr18	5.50 a	4.30 b	4.80 a, b		1.14
Mn35	11.00 a	8.90 b	7.70 c		0.14
Mg+	12.00 a	10.70 b		10.95 b	0.52
CPI1	1.60 b	1.20 c		4.22 a	0.35
a*	50	25	67	50	
b(%)	38	50	17	50	
c	12	25	33	0	

* a, b, c 分别代表显著程度 ($a > b > c$).a, b, c represent various level of significance respectively ($a > b > c$).

2.2 固氮活性

4种方法保藏的菌,活化后,生长良好,有固氮活性(表3)。无氮保藏的菌固氮活性高,有氮保藏的菌固氮活性低。

表3 不同保藏方法对 *Frankia* 固氮酶活性影响Table 3 The effect of different preservation methods for Nase activity of *Frankia* strains

菌种 Strain	固氮酶活性(C_2H_4 nmol/(mg 蛋白·h)) Nitrogenase activity (C_2H_4 nmol/(mg protein·h))				t 检验 LSD5%
	无氮液体(6年) Nitrogen-free liquid (6 years)	有氮液体(6年) Nitrogen liquid (6 years)	冷冻干燥(3.5年) Lyophilized milk (3.5 years)	砂管 Sterile sand (8 years)	
At4	28.00 a	21.90 c	24.95 b		0.60
Aph1	13.78 a	11.68 b	11.53 b		0.39
As2-8	6.95 b	2.13 c	7.84 a		0.27
Cc01	26.10 a	11.70 b	25.60 a		3.56
Hr18	34.80 a	19.40 c	30.60 b		1.40
Mn35	8.30 b	6.60 c	9.00 a		0.60
Mg+	5.73 a	5.07 b		4.93 b	0.34
CPI1	25.13 b	10.13 c		55.20 a	6.74
a*	62	0	50	50	
b(%)	38	38	50	50	
c	0	62	0	0	

* a, b, c 分别代表显著程度 ($a > b > c$).a, b, c represent various level of significance respectively ($a > b > c$).

2.3 回接感染

本试验只对有氮和无氮液体方法保藏的菌进行感染考查,选用两个菌株(Hr18, Cc01),每株菌用两种方法回接试验,每种方法重复3次。结果表明,两种方法保藏6年之久的两株菌仍具有侵染宿主的能力,每个试管和广口瓶中的小苗均结瘤。

综上所述,从形态方面看,*Frankia* 菌经四种不同方法保藏,其结果分为两种:第一,在有氮、无氮液体中保藏的菌,菌丝和孢囊不完整;第二,冷冻干燥、砂管中保藏的菌,孢囊和菌丝较完整。这主要由于前种结果保藏的试管虽胶塞将管口塞上,但未抽真空,给菌继续生长带来适合条件,使菌容易衰老,与后者比菌不易休眠。尽管在不同保藏方法过程中菌丝和孢囊完整程度各异,但经活化后,均有典型的 *Frankia* 菌形态和生理特性。经数理统计,不同保藏方法,菌的固氮活性和生长速度都表现出有氮液体保藏法不如其他方法。总体比较,作者认为无氮液体保藏法具有实用价值,不需要设备即可达到保藏目的,简单易行,该法能使供试菌保藏6年。

参 考 文 献

- [1] 丁蓁. 微生物学杂志, 1984, 4(2): 41.
- [2] Fontaine M *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 51(4): 694—697.
- [3] 白毓谦, 等. 微生物学实验技术. 济南: 山东大学出版社. 1986. 400.
- [4] Murry M A *et al.* *Plant and Soil*, 1984, 78: 61—78.
- [5] 徐卿德, 等. 微生物学杂志, 1990, 10(1, 2): 95—97.
- [6] 李钟庆. 微生物学报, 1980, 20(4): 373—384.
- [7] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248—255.
- [8] 邹辉, 等. 植物生理学报, 1990, 17(3): 301—306.
- [9] 李元旦, 等. 微生物学杂志, 1989, 9(3): 22—27.
- [10] Becking J H, Buchanan R E, Gibbons N E ed. *Bergey's of Determinative Bacteriology*. Baltimore: The Willams and Wilkins Co. 1974. 969—976.

CONSERVATION OF *FRANKIA* CULTURE

Su Fengyan Zhang Zhongze Li Weiguang
Wang Yuying Ding Jian

(*Institute of Applied Ecology, Academia Sinica, Shenyang 110015*)

Abstract Four conservation protocols of *Frankia* cultures were tested. Measured cell survival, morphology and nitrogen fixation activities of *Frankia* for each conservation protocol. Most sporangia and hypha were broken after storage in simple nitrogen-free liquid medium for 6 years. However, cultures stored in N-containing simple liquid medium for same time remained partially intact. Cultures stored in lyophilized milk for 3.5 years or in sterile sand for 8 years were mostly intact. All the cultures mentioned above grew well and showed nitrogenase activity as well as typical morphological characteristic after an adaption period. Compared with other protocols, simple nitrogen-free liquid medium protocol were shown better in the item of cell growth, infectiveness and effectiveness.

Key words *Frankia*, Conservation, Morphology