

木麻黄根瘤内生菌的分离、培养和回接*

康丽华 曹月华 吴英标

(中国林业科学研究院热带林业研究所)

摘要 从福建、广东、海南岛的木麻黄根瘤中分离到16株内生菌，它们都具有 *Frankia* 菌的典型形态特征。回接鉴定表明，除4株不侵染原寄主植物外，其余12株均具有侵染能力。但各菌株的侵染能力不同，这些菌株在培养基上的培养特征有一定的差异，实验菌株在 BAP 培养基上生长最好，在 Jan Blom、Qmod 等培养基上生长较差。

关键词 木麻黄；内生菌

自从1978年美国的 Callaham 等^[1]首次从香蕨木根瘤中分离出内生菌之后，国内外许多实验室也从桉木、杨梅、沙棘、胡颓子、木麻黄属等根瘤中分离得到弗兰克氏菌的离体培养^[2~5]。

1986年我们用根瘤切片法，从普通木麻黄 (*Casuarina equisetifolia*) 根瘤中分离得到16株纯培养的弗兰克氏菌，其中12株回接到宿主苗木上，形成根瘤，并有固氮活性。这为筛选木麻黄优良高效固氮菌株，以及对弗兰克氏菌的分类、生理生化及遗传特性等研究提供了有利条件。

一、材料与方 法

(一) 根瘤来源

木麻黄的野生根瘤采自福建省赤湖林场、海南省岛东林场、广东省湛江东海林场和港口林场等地，人工诱导根瘤取自本所木麻黄人工接种苗圃。

(二) 分离方法

取新鲜幼嫩根瘤，洗净表面泥沙，在95%的酒精溶液中浸泡30~60s，置于0.1%的酸性升汞溶液中，经5~8min取出，用无菌水冲洗干净，切成约0.1~0.5mm的薄片，置于S液体培养基^[6]中，在28~30℃恒温下培养。当瘤片长出菌落后进行镜检并转管培养。

(三) 自生固氮活性测定方法

制备无氮BAP培养基^[7]于18mm×180mm试管中，每管分装7ml，在28~30℃的恒温下培养30天后注入10%的乙炔，静置培养24h，然后测定固氮活性，每个菌株重复3次。

本文于1989年1月27日收到。

*本研究是法国资助的FAO项目“固氮木本树木改良”的一部分；中国科学院微生物研究所阮继生教授指导本项工作并鉴定部分菌株；参加本项工作的还有郭丽云、姚玉华、林毅同志。

(四) 回接试验

供回接试验的木麻黄有实生苗和扦插条两种。种子经0.5%的 KMnO_4 溶液消毒,扦插条经0.1%的升汞溶液消毒,在灭过菌的容器内培养至发芽、生根,并进行砂培和水培。培养基质(砂或蛭石等)经高压蒸汽灭菌,水培液用凉水配制,营养液采用 Sideris Young 配方^[8],育苗时加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (回接后不加)。

以1至1个半月菌龄接种,3个接种管约含150个菌落,用灭过菌的玻璃研磨器研磨制备菌悬液。每个菌株号接种10~15株苗。将培养2个月的实生苗根部洗净,修剪苗木的根至2cm,扦插条长至10cm、根长2cm时接种 *Frankia* 菌。接种时将经过修剪后的苗木和扦插条浸于上述制备的菌悬液中,经30min移入基质内,置于温度为23~32℃、光照为6000lx的室内培养,重复1~10次,每周补充营养液一次。以不接种的苗木作对照。

对人工接种诱导形成的根瘤,按沈善敏修改的方法取样0.1g,以 Shimdezu M-9A 气相色谱仪,测定乙炔还原活性^[9],重复2次。

二、结 果

(一) 分离菌的一般形态特征

从木麻黄天然和人工诱导根瘤中分离的16株弗兰克氏菌株,它们的形态特征相似。液体培养时在试管底部呈圆球形颗粒状生长或菌落沿试管壁生长,菌落边缘不整齐,培养液不混浊,慢生型,经光学显微镜观察,确认是属多态型孢囊放线菌。其形态特征是菌丝长、弯曲、分枝有隔、粗细不均,直径为0.5~2.1 μm 。菌丝任何部位均能膨大形成特征性孢囊。孢囊形状各异,多呈圆形、椭圆形、草莓形、棒状形和穗形等,或呈不规则形状,大小不一,通常约4~35 μm ×3~44 μm ,最大可达50~60 μm 。表面不光滑,有的可见到粗大孢囊柄,柄上有横隔,成熟孢子囊壁膜破裂后释放出孢子,孢子圆形或不规则,直径约2 μm ;固氮孢囊体(visicles)呈球形、卵圆形,表面光滑,多着生在菌丝体一侧的细小分枝上,其直径约2~3.7 μm (见图版I)。这些菌株形态特征均与 H. G. Diem 等人描述^[4,6]的相同。

(二) 不同培养基的培养特征

上述分离菌株在 BAP、无氮 BAP (BAP-N)^[7]、Jan Blom^[10]、Qmod^[11]、B/2^[12]、S^[6]、S+T^[6]、葡萄糖天门冬素(GUA)^[13]、蔗糖硝酸盐(YCZ)^[13]液体培养基上的生长情况基本一致,其中以 BAP 液体培养基的菌株生长最好,菌落呈圆球形颗粒状沉淀,直径约0.5~2.0mm,颜色呈荔肉白或蚌肉白。经显微镜观察,在 BAP 液体培养基上可见到菌体形成很多孢子囊,孢囊(vesicles)较少,在无氮 BAP 培养基上形成很多孢囊,孢子囊也较多,在 Jan Blom 和 Qmod 等液体培养基上生长较差。

(三) 回接试验

在接种弗兰克氏菌后10~30天内,不定根的侧根极权处长出星状毛,其下有白色或红色小凸起,7~10天后发育成小瘤瓣,继而长成一个小根瘤簇。同时星状毛延伸呈负向地性的根瘤毛。根瘤颜色有白、黄白及红色三种。瘤瓣有长形和短形两种,与野外观测结果相似。绝对空白对照株均不结瘤。

回接试验结果表明,在这些分离菌中,除了4株 *Frankia* 菌不能在原宿主植物上形成根

瘤外, 其余12株菌均能在原宿主植物木麻黄根上形成根瘤, 而且用乙炔还原法能测出其固氮酶活性。但这12株 *Frankia* 菌在侵染结瘤能力、结瘤数量和固氮活性上存在着差异(表1)。

表1 分离菌株的根瘤来源、结瘤能力和固氮酶活性测定

菌株号	根瘤来源	寄主材料		培养基质		培养条件		结瘤率 (%)	结瘤数 (个/株)	根瘤(鲜)乙炔 还原活性 (C_2H_2 μ mol/ g·h)
		实生苗	扦插条	砂培	水培	室内	温室			
TFI 86001	福建赤湖林场	✓	✓	✓	✓	✓	✓	100	36	11.935 4
TFI 86002	海南省岛东林场	✓	✓	✓	✓	✓	✓	100	1.8	8.680 0
TFI 86003	海南省岛东林场	✓	✓	✓	✓	✓	—	0	0	—
TFI 86004	港口林场	✓	✓	✓	✓	✓	✓	0	0	—
TFI 86005	海南省岛东林场	✓	✓	✓	—	—	—	100	15.1	2.009 2
TFI 86006	海南省岛东林场	✓	—	—	✓	✓	—	0	0	—
TFI 86007	海南省岛东林场	✓	✓	✓	✓	✓	—	92.8	44	—
TFI 87023	广东东海林场	✓	✓	✓	✓	✓	✓	100	2.5~7	15.603 2
TFI 87024	广东东海林场	✓	✓	✓	✓	✓	✓	33~80	2~11.75	17.212 8
TFI 87326	广东东海林场	✓	✓	✓	✓	✓	✓	75~100	3.25~73.6	6.955 9
TFI 87327	广东东海林场	✓	✓	✓	✓	✓	✓	60~100	28~80	14.865 3
TFI 87028	广东东海林场	✓	✓	✓	✓	✓	✓	100	4~107	13.748 2
TFI 87103	广东东海林场	✓	✓	✓	✓	✓	—	100	4.4	—
TFI 87167	广州热林所诱导根瘤	✓	✓	✓	✓	✓	—	91.7	4.4	—
TFI 87219	广州热林所诱导根瘤	✓	✓	✓	✓	✓	—	100	2~3.4	—
TFI 87223	广东东海林场	✓	✓	✓	✓	✓	—	0	0	—

三、讨 论

1. 选择合适的分离培养基是分离成败的主要因素。我们用酪蛋白水解物作培养基氮源的S培养基后, 均获得成功。说明木麻黄内生菌对氮源的要求较严格。

2. 根瘤表面消毒十分困难, 为了防止污染, 通常采用增加消毒剂浓度和延长消毒时间, 但这样极易造成消毒剂对内部有机体的损害。因为非豆科植物与豆科植物根瘤不一样, 其细胞间隙较大, 氧分压高^[14], 消毒剂通过细胞空隙浸入根瘤内部, 损坏了有机体。所以, 选择合适的根瘤表面消毒剂及掌握适宜的消毒时间是十分重要的。经过反复试验表明, 认为本试验所采用的消毒方法是较好的。

3. 在分离的16株弗兰克氏菌中, 有4株不能在原宿主植物上结瘤。经测定, 试管内纯培养物具有一定的固氮活性, 如TFI 86003和TFI 86004菌株的固氮量分别为0.2012和0.01038 μ g/天·管。但这些菌株在原宿主木麻黄上反复回接10余次, 又用同属的细枝木麻黄(*Casuarina cunninghamiana*)交叉回接数次, 均不见结瘤。李忠伟等^[15]认为, 分离所采用的根瘤来源可能影响到菌株的侵染能力, 直接从野生根瘤分离的菌株, 回接效果较好。而我们用人工诱导根瘤分离的TFI 87167和TFI 87219菌株, 均能在原宿主植物上结瘤。相反地, 直接从野生根瘤分离的TFI 86003、TFI 86004、TFI 86006和TFI 87223等菌株, 则不能在原宿主植物上结瘤。因此, 我们认为, 弗兰克氏菌从与树木根瘤共生到腐生生活, 菌体在适应这种环境而产生的变异, 可能会影响其结瘤能力。

参 考 文 献

- [1] Callaham, D. et al., 1978, *Scienci.*, 199, 899~902.
- [2] 蒋建德等, 1984, *微生物学报*, 24(1): 37~40.
- [3] 杨惠凡等, 1984, *微生物学报*, 24(1): 315~319.
- [4] Diem, H. G. et al., 1982, *Can. J. Microbiol.*, 28, 526~530.
- [5] Diem, H. G. et al., 1983, *Can. J. Microbiol.*, 61, 2815~2821.
- [6] Lechevalier, P. et al., 1983, *Can. J. Bot.*, 61, 2826~2833.
- [7] Murry, M. A. et al., 1984, *Plant and Soil.*, 78, 61~78.
- [8] Sideris, C. P. et al., 1946, Effects of nitrogen on growth and constituents of *Ananas comosus* (L.), Merr., *Plant. Physiol.*, 21, 247.
- [9] 沈善敏等, 1983, 中国科学院林业土壤研究所集刊, 第6集.
- [10] Blom, J. et al., 1980, *FEMS Microbiol. Letters.*, 9, 135.
- [11] Lalonde, M. et al., 1979, *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests* (ed. by Gordon, J. C. et al.). Oregon state university press, 95~110.
- [12] Baker, D. et al., 1980, *Can. J. Microbiol.*, 26(9): 1066~1071.
- [13] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组编写, 1975, 链霉菌鉴定手册, 科学出版社.
- [14] Tiepkema, J., 1979, *Symbiotic Nitrogen in the Management of Temperate Forests* (et. by Gordon, J. C. et al.), Oregon state university press, Oregon, 175~186.
- [15] 李忠伟等, 1986, *微生物学报*, 26(4): 295~301.

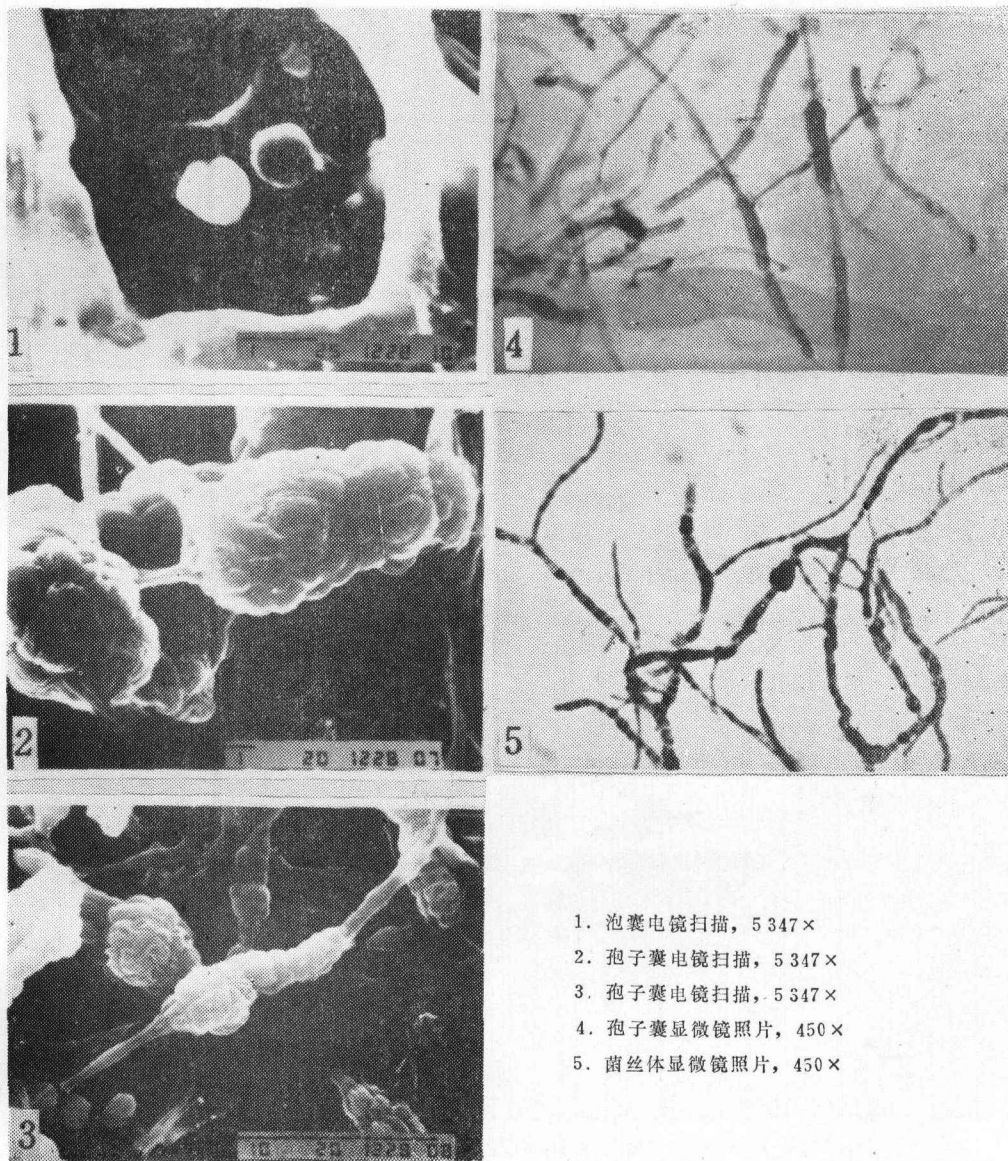
ISOLATION, CULTURE AND INOCULATION OF *FRANKIA* FROM THE NODULES OF *CASUARINA*

Kang Lihua Cao Yuehua Wu Yingbiao

(The Research Institute of Tropical Forestry CAF)

Abstract Sixteen endophytic actinomycetes were isolated from the nodules of *Casuarina equisetifolia* planted in Fujian, Guangdong and Hainan island. All of them have the typical morphological characteristics of *Frankia*. 12 out of 16 strains have infecting abilities, but infecting abilities of these isolates are different from each other. The strains showed differences in cultural characteristics. The tested strains grew well on BAP medium but grew poorly on Jan Blom or Qmod medium.

Key words *Casuarina equisetifolia*; endophytic actinomycete



1. 孢囊电镜扫描, 5 347 ×
2. 孢子囊电镜扫描, 5 347 ×
3. 孢子囊电镜扫描, 5 347 ×
4. 孢子囊显微镜照片, 450 ×
5. 菌丝体显微镜照片, 450 ×