

# 一株弗兰克氏菌的分离培养及特性研究\*

谢一青

(福建省林业科学研究院 福州 350012)

**摘要:** 用根瘤匀浆法, 从粗枝木麻黄 (*Casuarina glauca*) 根瘤中分离到一株内生菌 FCg77。生物学特性试验表明: 该菌株的适宜分离培养基为 BAP 培养基, 最佳碳源为吐温-80, 最适氮源为牛肉膏, 能耐 5% 的盐分, 生理类型为 AB 型, 细胞壁化学组分为 III 型。结合回接试验结果, 初步判定分离菌株 FCg77 应属于弗兰克氏菌 (*Frankia*) 的成员。

**关键词:** 弗兰克氏菌, 生物学特性, 固氮, 粗枝木麻黄

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0009-05

## Isolation and Characterization of a *Frankia* Strain from *Casuarina glauca*

XIE Yi-Qing

(Fujian Academy of Forestry, Fuzhou 350012)

**Abstract:** A strain FCg77 was isolated from root nodule of *Casuarina glauca* by the squashing. The biological characteristics experiments demonstrated that the optimum culture medium was BAP, and the optimum carbon and nitrogen sources were tween-80 and beef. Strain FCg77 could endure 5% salinity. The strain was divided into physiological group AB, and the cell wall chemical composition was type III strain. And combined with the results of back inoculation tests, the strain of FCg77 was preliminary identified as a member of *Frankia*.

**Key words:** *Frankia*, Biological characteristics, Nitrogen fixation, *Casuarina glauca*

弗兰克氏菌 (*Frankia*) 是一类能在非豆科植物根部形成根瘤而进行共生固氮作用的放线菌<sup>[1]</sup>。能与弗兰克氏菌共生形成根瘤的植物统称为放线菌结瘤植物, 其具有很强的共生固氮能力, 且分布广, 是陆地生态系统中重要的氮供给者, 因而在农业和林业上具有广泛的应用前景。弗兰克氏菌的分离工作始于 20 世纪初, 限于当时的技术水平, 直至 1978 年 Callaham 等<sup>[2]</sup> 人从香蕨木根瘤中分离出弗兰克氏菌并成功进行了离体培养, *Frankia* 的研究工作才有较大的进展。到目前为止, 国内外已从杨梅、桉木、沙棘、木麻黄等不同放线菌结瘤植物根瘤中分离到内生菌纯培养物, 但对从粗枝木麻黄中分离 *Frankia* 菌株的研究报道甚少<sup>[3,4]</sup>, 且不系统。作者于 2000 年从福建沿海防护林粗枝木麻黄 (*Casuarina glauca*) 根瘤中成功地分离到一株根瘤内生菌, 编号为 FCg77, 通过对其形态特征、培养特性、耐盐性、回接侵染能力、固氮能力以及分类方面进行了系统的研究, 以初步确定该菌的分类地位及其特性, 并为其应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 根瘤来源

粗枝木麻黄野生根瘤于 2000 年 5 月采自福建省福清市沿海防护林。用于比较的参

\* 福建省自然科学基金项目资助 (No. B993001)

收稿日期: 2003-09-24, 修回日期: 2004-03-11

考菌株 9550 分离自短枝木麻黄, 系中国林业科学院热带林业研究所康丽华女士惠赠。

## 1.2 菌种分离与培养

新鲜根瘤用水冲洗干净, 分开瘤瓣。用镊子将瘤瓣置于 95% 乙醇中浸泡 1 min, 无菌水冲洗数遍, 再浸入 0.1% 酸性  $\text{HgCl}_2$  中消毒 5~8 min, 取出, 无菌水冲洗数遍, 去皮, 加少量无菌水用玻璃匀浆器研磨匀浆, 取一定量匀浆分别接种于装有 BAP<sup>[5]</sup>、JA<sup>[6]</sup>、S<sup>[7]</sup> 和 Qmod<sup>[8]</sup> 液体培养基的试管中, 置恒温箱中, 28℃ 静置培养。菌落长出后转到 BAP 培养基 (主要成分: 丙酸钠 10 mmol/L, 氯化氨 5.0 mmol/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 mmol/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.07 mmol/L,  $\text{FeNaEDTA}$  0.02 mmol/L, pH6.7 的磷酸缓冲液 10 mmol/L 等, pH6.7) 上进一步纯化, 观察生长和色素的产生状况。用光学显微镜 (Olympus BH-2) 和扫描电子显微镜观察形态特征。

## 1.3 碳氮源利用试验

碳源和氮源利用试验均按文献 [7] 的方法进行。

## 1.4 细胞壁化学组分测定

参考梁蓉芳等<sup>[9]</sup>的方法。参考菌株 9550 胞壁组分类 III 型。

## 1.5 生理类型测定

根据 Lechevelier (1983) 的生理类群划分方法<sup>[7]</sup>, 将菌株 FCg77 分别接种于以下 6 种培养基: ① NAZS 基础培养基<sup>[7]</sup>, 简称 S; ② S+1% 葡萄糖, 简称 10S; ③ S+2% 葡萄糖, 简称 20S; ④ S+0.2% Tween-80, 简称 T+S; ⑤ S+0.2% Tween-80+1% 葡萄糖, 记为 T+10S; ⑥ S+0.2% Tween-80+2% 葡萄糖, 简称 T+20S。28℃~30℃ 恒温培养, 并分别于第 2、4、6、8 周离心收集菌丝体, 测干重。实验重复 3 次。

## 1.6 耐盐能力测定

以 BAP 为基础培养基, 分别添加浓度为 1%、2%、3%、4%、5% 的氯化钠, 灭菌后, 接入等量的菌体, 28℃~30℃ 恒温培养 1 个月, 以不含氯化钠的 BAP 为对照。实验重复 3 次。

## 1.7 纯培养物 FCg77 的回接

回接试验选用粗枝木麻黄无性系水培苗。将根长至 3~4 cm 的无性系苗移植到装有经高温灭菌的珍珠岩基质的营养袋中, 每袋 1 株, 温室培养。待幼苗定植后, 每株接种 10 mL 菌悬液 (约含湿菌体 10mg), 同时以不接种的幼苗作对照。每隔 2 周用无氮的 Sideria-Young 营养液<sup>[10]</sup> 浇 1 次, 6 个月后检查结瘤情况。

## 1.8 固氮酶活性和植株含氮量的测定

菌株 FCg77 的自生和共生固氮活性用乙炔还原法测定, 检测仪器为岛津 GC-5A 气相色谱仪。植株含氮量用全碳氮分析仪 NC-80 测定。

# 2 结果与分析

## 2.1 形态和培养特征

从粗枝木麻黄根瘤中分离到的 FCg77 纯培养内生菌, 经光学显微镜和扫描电镜观察, 菌丝呈分枝丝状, 粗细不均, 有横隔, 直径 0.5~2.0  $\mu\text{m}$ , 菌丝顶端有椭圆形或不规则形的孢囊 (Sporangium) 如图 1a 和 b。在无氮诱导的 BAP 液体培养基中生长的菌丝体, 在显微镜下可看到着生在菌丝体一侧的细小分枝上多呈圆形的孢囊 (Vesicle), 直径约 1.0  $\mu\text{m}$ 。菌株 FCg77 在 4 种液体培养基上的生长情况基本一致, 多数菌丝体沉在试

管底部呈圆球形颗粒状生长,其中以BAP液体培养基生长最好,其次是JA和S,而在Qmod液体培养基上生长最差。

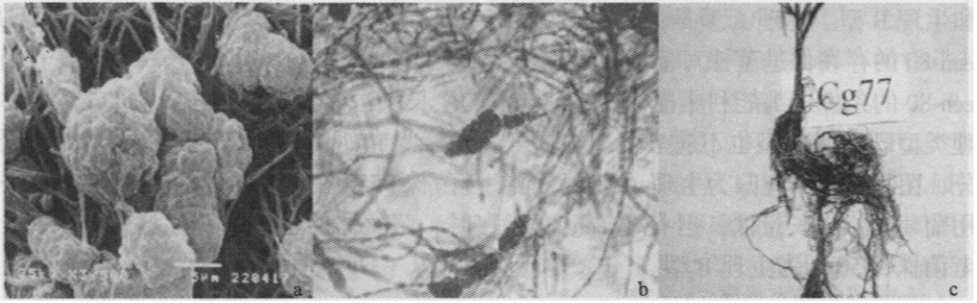


图1 菌株FCg77的形态及其在粗枝木麻黄上回接的根瘤  
a 孢囊( $\times 3,500$ ), b 不规则的孢囊和菌丝( $\times 1,500$ ),  
c 菌株FCg77回接产生的根瘤(图中箭头所指为根瘤)

## 2.2 细胞壁化学组分

FCg77的细胞壁水解物经薄层层析显示有内消旋的二氨基庚二酸(m-DAP)和甘氨酸。应用氨基酸自动分析仪测定了谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸和二氨基庚二酸等4种氨基酸的含量。结果表明,若以其中DAP的摩尔数为1换算其它3种氨基酸的相对比值(分子比)来看,FCg77与胞壁III型的参考菌株9550一样,甘氨酸含量很低,而丙氨酸含量则很高。因此,FCg77的胞壁氨基酸组分应属于III型。同时,菌株FCg77的全细胞水解物经薄层层析检测表明,它含有木糖和少量半乳糖。

## 2.3 碳、氮源利用

在不含丙酸钠的BAP培养基基础上添加1%的不同碳源,培养结果表明:吐温-80和一些小分子单糖对菌株FCg77和9550的生长都有利,特别是以吐温-80的利用为最好。在不含氯化氨的BAP培养基上添加不同的氮源,结果菌株FCg77和9550分别以牛肉膏和酪蛋白的利用为最好(表1)。

表1 菌株FCg77对不同碳源和氮源的利用

碳源	生长状况		氮源	生长状况	
	FCg77	9550		FCg77	9550
无碳源	-	-	无氮源	-	-
葡萄糖	-	-	硫酸氨	+-	++
果糖	-	-	硝酸钾	-	+
木糖	+-	+-	牛肉膏	+++	++
淀粉	-	+	干酪素	-	++
甘露糖	+-	-	酪蛋白	-	+++
山梨醇	-	-	蛋白胨	+-	-
乳糖	-	-	尿素	-	-
蔗糖	+-	-			
吐温-80	+++	+++			
丙三醇	+-	-			
麦芽糖	-	-			

注: - 不生长, + 生长, ++ 生长好, +++ 生长最好, +- 生长可疑

## 2.4 生理类型

Lechevalier (1983) 根据 *Frankia* 能否利用 Tween-80 而将其分成二个亚群<sup>[7]</sup>, 生理 A 型和生理 B 型。生理 A 型是: Tween-80 的存在抑制菌株对葡萄糖的利用; 生理 B 型是: Tween-80 的存在促进菌株对葡萄糖的利用。试验结果 (图 2) 表明, 菌株 FCg77 在有无 Tween-80 的条件下都能利用葡萄糖, 菌丝体的生长量也比较接近, 这表明 FCg77 菌株的生理类型既不属于 A 型也不属于 B 型。根据王晨光等<sup>[11]</sup>和胡传炯等<sup>[12]</sup>对这类菌的生理类型划分, 菌株 FCg77 应归为生理 AB 型。而参考菌株 9550 在无 Tween-80 的培养基中不能利用葡萄糖, 生长量低, 但有 Tween-80 存在时, 菌丝体的生长量明显增多, 因此, 将参考菌株 9550 划为生理 B 型。

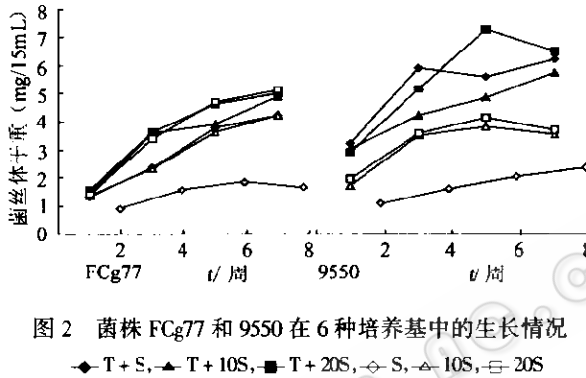


图 2 菌株 FCg77 和 9550 在 6 种培养基中的生长情况

◆ T+S, ▲ T+10S, ■ T+20S, ◇ S, △ 10S, □ 20S

## 2.5 菌体耐盐能力

试验结果表明, FCg77 在含 5% 的 NaCl 培养基中仍有一定生长, 说明菌株耐盐能力强。试验还发现: 在含 1% 和 2% NaCl 的 BAP 培养基中该菌株生长基本不受影响, 与对照相比, 菌丝体干重没有减少, 而当 NaCl 浓度大于或等于 3% 时, 菌丝体干重随盐浓度的增大而减少, 菌丝生长不良, 但仍有一定生长。

## 2.6 纯培养物的回接及固氮活性

从放线菌结瘤植物根瘤内分离获得的内生菌纯培养物, 必须通过柯赫法则的检验, 即回接宿主植物, 能结瘤的方可确认为共生放线菌。温室条件下, 菌株 FCg77 对粗枝木麻黄的回接试验结果 (图 1c 和表 2) 表明: 菌株 FCg77 的侵染能力是明显的, 回接粗枝木麻黄苗木 32 株全部结瘤, 且与对照组相比, 接种后苗木的株高、生物量和含氮量都明显高于对照。从表 2 还可以看出, 菌株 FCg77 在离体培养下的自生固氮酶活性和根瘤固氮活性的差异很大。

表 2 FCg77 菌株的侵染结瘤能力和固氮活性

处理	株数	平均株高 (cm)	平均结瘤 (个/株)	结瘤率 (%)	生物量		含氮量 (%)	根瘤固氮酶活性 (C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> μmol/g·h)	自生固氮酶活性 (C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> μmol/g·h)
					植株鲜重 (mg)	植株干重 (mg)			
接种	32	44.3	3.6	100	30.44	2.97	2.90	8.48	1.33
CK	30	26.2	0	0	21.61	1.24	1.67	/	/

## 3 结论与讨论

(1) 实验结果表明, 菌株 FCg77 的菌丝体呈分枝丝状, 有明显的孢囊和孢囊特征,

生理类型属 AB 型, 细胞壁氨基酸组分为 III 型, 并能成功地回接原寄主植物。同时, 国际上公认的弗兰克氏菌属的定义: *Frankia* 内生菌在形态特征方面的描述为“内生菌呈放线菌样, 在液体培养基中形成产生不动孢子的孢囊, 有可能形成泡囊”。因此, 通过对菌株 FCg77 形态学、细胞化学、与植物的共生固氮能力以及生理类型等指标进行综合考虑, 可以初步判定该菌株应属于放线菌目弗兰克氏菌科弗兰克氏菌属。

(2) 本文虽已初步确定菌株 FCg77 属于弗兰克氏菌属的成员, 但关于菌株 FCg77 的分种, 依现有的资料尚难作出结论。迄今为止, 世界上公认的只有属的存在, 且属以上的分类地位基本确定, 而对于 *Frankia* 种的划分还没有一个明确和统一的指标。如何利用 DNA-DNA 杂交、16SrRNA 和 *nif* 基因序列分析等分子生物学试验研究, 以确定该菌株的种, 是下一步研究的方向。

(3) 菌株 FCg77 在人工培养下耐盐能力较强, 在含 5% NaCl 的液体培养基中仍具有一定的生长能力, 这可能与其宿主的生长环境有关, 同时, 也说明该菌株能够适应高盐分的沙地环境, 这对于在盐分较高的沿海沙地进一步推广应用具有很大的价值。

(4) *Frankia* 是微好氧菌, 生长缓慢, 通常较难大量培养。但从本研究的试验结果可以看出, 通过调节培养基, 特别是选用适宜的碳源和氮源可能可以进一步提高菌丝体的生物量。这方面的研究有待于进一步深入。

### 参 考 文 献

- [1] 洪国藩, 宋鸿遇. 固氮之光. 长沙: 湖南科技出版社, 1997. 134 ~ 136.
- [2] Callahan D, Del Tredici P, Torrey J G. *Science*, 1978, **199**: 899 ~ 902.
- [3] Hassan M A. *J Union Arab Biol Cairo*, 1999, **8** (B): 375 ~ 387.
- [4] 李志真, 李朝晖, 俞如礼, 等. 福建林业科技, 1998, **25** (3): 17 ~ 22.
- [5] Murry M A, Fontaine M S, Torrey J G. *Plant and Soil*, 1984, **78**: 61 ~ 78.
- [6] Akkermans A D L, Roelofsen W, Blom J, et al. *Can J Bot*, 1983, **61**: 2793 ~ 2800.
- [7] Lechevalier M P, Baker D, Horriere F. *Can J Bot*, 1983, **61**: 2826 ~ 2833.
- [8] Lalonde M, Calvert H E, Pine S. Isolation and use of *Frankia* strains in actinorhizae formation. In: Gibson A H, Newton W E. ed. *Current Perspective in Nitrogen Fixation*. Canberra: Australian Academy of Sciences, 1981. 196 ~ 199.
- [9] 梁蓉芳, 袁德军, 夏涛, 等. 微生物学通报, 1990, **17** (4): 247 ~ 249.
- [10] 休伊特 E J (崔徽等译). 植物营养研究的砂培与水培法. 北京: 科学出版社, 1965. 91 ~ 98.
- [11] 王晨光, 宋尚直, 阮继生. 微生物学报, 1993, **33** (4): 297 ~ 303.
- [12] 胡传炯, 周平贞, 周启. 微生物学报, 1997, **37** (6): 417 ~ 422.