

几种非豆科植物根瘤内生菌的形态和培养特征

杜大至 王毅岩 李荣儿 崔国良 原福虎

(山西省生物研究所,太原)

弗兰克氏菌可以侵染许多非豆科植物的根系形成根瘤。这种共生固氮作用是陆地生态系统中氮素的重要来源,对于改良土壤、提高土壤肥力有着重要意义,不少植物还具有较高的经济价值。多年来,由于这种根瘤内生菌的分离十分困难,因此人们一直认为这种固氮放线菌不能人工培养^[1,8]。1978年 Callaham 等^[2]用酶

解法首次分离成功这种内生菌。此后,世界各国又采用不同的方法从大约8个属的非豆科植物根瘤中分离出一批内生菌。因此,对于这种非豆科植物共生固氮作用的研究,目前已引起国内外的广泛重视^[3]。

国内对于内生菌的分离工作,目前已开始陆续报道^[4,5]。我们继1981年3月用组织培养

法^[5]从中国沙棘根瘤中分离到国内第一株弗兰克氏菌——*Frankia* sp. HR104 菌株之后,又采用相同的方法从胡颓子属 (*Elaeagnus*) 和桤木属 (*Alnus*) 中的四种非豆科植物根瘤中分离到一批内生菌,然后选各自的代表菌株进行回接并获得成功。此后,又对上述五株菌进行了分类鉴定方面的研究。本文仅对其形态特征作了较为详尽的介绍,并对其培养特征进行了初步描述。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

1. *Frankia* sp. HR104。寄主植物: 中国沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis* Rousi)。分离日期: 1981年3月。

2. *Frankia* sp. EU131。寄主植物: 伞花胡颓子 (*Elaeagnus umbellata* Thunb.)。分离日期: 1981年8月。

3. *Frankia* sp. EM273。寄主植物: 翅果油树 (*Elaeagnus mollis* Diels)。分离日期: 1982年2月。

4. *Frankia* sp. EA118。寄主植物: 沙枣 (*Elaeagnus angustifolia* L.)。分离日期: 1983年9月。

5. *Frankia* sp. AC160。寄主植物: 川桤木 (*Alnus cremastogyne* Burk.)。分离日期: 1983年3月。

(二) 方法

光学显微镜和扫描电镜制片均按涂片法^[6]进行。培养特征按常规进行^[7,8]。

(三) 仪器及测试条件

光学显微镜: OLYMPUS BHS-313型。

电子显微镜: JSM-35C型扫描电镜。样品经 JFC-1100型离子溅射仪喷金。测试电压 15 kV, 放大倍数 4,000—20,000倍。

结 果

(一) *Frankia* sp. HR104 菌株

1. 菌体形态: 菌丝粗细不匀, 分枝有横隔, 直径 0.5—1.4 μ m。其末端、侧面或丝间可生成

球形、卵圆形、梨形、葫芦形、谷穗形等多种形态的孢囊, 直径 3—18 μ m, 长可达 35 μ m。孢囊内在不同平面上发生纵横分裂形成孢囊孢子, 成熟后便释放出来。孢子为不规则的球形或卵圆形, 直径约 1.5—4 μ m, 无鞭毛、不游动。在适宜的培养基上可萌发出新的菌丝。在菌丝的侧面可以长出球形或卵圆形的固氮孢囊, 直径 1.5—4 μ m, 着生在 2—10 μ m 的孢囊柄上。菌丝、孢囊、孢子、孢囊革兰氏染色均为阳性。

在扫描电镜下可以观察到, 孢囊表面凸凹不平, 有瘤状和丘状凸起。成熟孢囊表面常可显示出囊内孢子的明显轮廓。孢囊孢子表面比较光滑, 除有一些皱褶外再无任何装饰物。孢囊的表面也比较光滑, 但有的孢囊表面有较大的皱褶, 在一些皱缩孢囊的表面甚至出现一至多处较大的凹陷。

2. 培养特征: 在 CMS-1 号琼脂上生长较好, 培养初期菌落为蛋壳黄或瓜瓢粉色*, 培养中颜色加深, 后期呈南瓜黄乃至桔橙色。菌丝体与孢囊、孢子颜色基本一致。转接后培养的菌落直径约 2—10mm, 多呈瘤状凸起, 略有光泽, 不形成气生菌丝, 基内菌丝长在培养基表层。但在培养基种类、pH 或氮源等不同的情况下, 培养日久基内菌丝亦可长入培养基深处。在 CMS-1 号培养基、甚至一些简单的有机或合成培养基上, 一周后菌体开始生长, 半个月左右长成明显的菌落, 一个月后菌落仍有扩大的趋势。好气或微量好气, 在液体培养基中振荡或静置培养均可生长, 但更适于在固体培养基上生长。在 CMS-3 号、克氏合成一号、葡萄糖天门冬素、马铃薯浸汁、QMOD、察氏、苹果酸钙琼脂和无氮琼脂上生长较好; 在 CMS-2 号、甘油苹果酸钙、燕麦粉琼脂和马铃薯块上可以生长; 在 Blom、高氏合成一号、伊莫松、无机盐淀粉、酵母膏、蛋白陈察氏、甘油察氏、甘油天门冬素、酪氨酸琼脂上生长较差、生长可疑或不生长。

(二) *Frankia* sp. EU131 菌株

1. 菌体形态: 菌丝有分枝及横隔, 直径

* «色谱», 科学出版社, 北京, 1957。

0.8—2 μm ，它的任何部位都可以膨大，形成球形、卵圆形、梨形、长穗形等多种形态的孢囊，其中长穗形孢囊较多(图版 I-1)。圆形孢囊一般 6—18 μm ，穗形孢囊直径 2—9 μm ，长为 5—40 μm 。孢囊表面凸凹不平，有较多的瘤状或丘状凸起，可以显示出囊内孢子的明显轮廓。孢囊成熟放出孢子，孢子呈不规则的球形或卵圆形，直径 1.5—3.5 μm ，表面大都有较多的皱褶，无鞭毛、不游动。固氮孢囊为球形或卵圆形，直径 2 μm 左右，表面一般比较光滑，但也可见到较小的凸起或皱褶。在无氮培养基上生长较好，但未观察到大量孢囊形成。

2. 培养特征: 在 CMS-1 号琼脂上可以生长，培养初期为玫瑰粉色，后期为落霞红。菌落呈圆形瘤状小凸起，但不十分规则，边缘较整齐，直径 0.5—2mm，略有光泽。不长气生菌丝，基内菌丝多长在培养基表面或浅层，半月左右明显生长，30—40 天形成完整的菌落，继续培养菌体增长缓慢。好气或微量好气，在液体培养基中，振荡或静止培养均可生长。在 CMS-2 号、克氏合成一号、葡萄糖天门冬素、马铃薯浸汁琼脂上生长较好；在察氏、苹果酸钙、燕麦粉、CMS-3 号、QMOD、Blom 琼脂和无氮琼脂上可以生长；在其它各种琼脂上生长极差，生长可疑或不生长。

(三) *Frankia* sp. EM273 菌株

1. 菌体形态: 菌丝分枝有横隔，直径 0.8—1.5 μm ，它的任何部位都可以发生膨大，形成不规则的球形、卵形、穗形等多形态的孢囊，直径 5—12 μm ，长可达 28 μm 。孢囊破裂后释放出孢囊孢子(图版 I-2)。孢囊表面不平整，有瘤状凸起。孢子呈不规则的球形或卵圆形，直径 1.5—3 μm ，表面有较多的皱褶或较小的瘤状凸起，无鞭毛、不游动。在 CMS-1 号和无氮培养基上可以形成少量圆形或卵圆形的固氮孢囊(图版 I-4)，直径 1.5—3 μm ，表面较光滑，但皱缩孢囊表面有少量皱褶。

2. 培养特征: 在 CMS-1 号琼脂上可以生长，培养初期为玫瑰粉色，后期呈榴萼黄。菌落呈圆形瘤状小凸起，直径 0.5—2mm，略有光

泽、边缘较整齐。不形成气生菌丝，基内菌丝生长在培养基表面或浅层。15 天左右可见明显生长，30—40 天形成完整的菌落，继续培养菌体增长缓慢。好气或微量好气，在液体培养基中振荡或静止培养均可生长。在马铃薯浸汁琼脂上生长稍好；在葡萄糖天门冬素、克氏合成一号、察氏、苹果酸钙、燕麦粉、CMS-2 号、CMS-3 号、QMOD 琼脂上可以生长；在其它各种琼脂上生长极差，生长可疑或不生长。

(四) *Frankia* sp. EA118 菌株

1. 菌体形态: 菌丝分枝有横隔，直径 0.8—1.3 μm ，任何部位都可以膨大，形成不规则的球形、卵圆形和穗形孢囊(图版 I-3)，直径 2—10 μm ，长可达 35 μm 。也可由菌丝分裂成链状孢子(图版 I-5)。孢囊表面凸凹不平，有丘状和瘤状凸起。孢囊孢子形状宛如石榴子，大小 1.5—4 μm ，表面较光滑，但也可出现少量小瘤状凸起或皱褶，无鞭毛、不游动。孢囊直径 2—4 μm ，球形或卵圆形，表面较光滑，有时可见到少量皱褶或凸起。

2. 培养特征: 在 CMS-1 号琼脂上生长较好，培养初期菌落呈麦芽糖黄或蜜黄，培养日久成槟榔棕至落叶棕色。菌落较分散，直径 0.5—2.5mm，呈不规则的圆形，边缘较整齐，略有光泽。无气生菌丝，基内菌丝生长在培养基表面或浅层，半月左右见到明显生长，一个月左右形成明显的菌落，继续培养菌体增长缓慢。好气或微量好气，在液体培养基中振荡或静止培养均可生长。在克氏合成一号和马铃薯浸汁琼脂上生长较好；在苹果酸钙、葡萄糖天门冬素、QMOD、察氏、甘油苹果酸钙、CMS-2 号、CMS-3 号琼脂和无氮琼脂上可以生长；在其它各种培养基上生长极差、生长可疑或不生长。

(五) *Frankia* sp. AC160 菌株

1. 菌体形态: 菌丝较细，少弯曲，直径 0.5—1 μm ，分枝有横隔，某些部位可以膨大，形成不规则的球形、卵圆形或梨形的孢囊(图版 I-6)，直径 6—15 μm 。未见穗状孢囊。孢囊表面凸起较少。孢囊孢子呈不规则的球形或卵圆形，表面有皱褶或小的瘤状凸起，直径 1—2 μm 。

孢囊较少, 圆形或卵圆形, 表面较光滑, 直径 $2\mu\text{m}$ 左右。

2. 培养特征: 在 CMS-1 号琼脂上生长较差, 在 Blom 液体培养基上生长稍好。但该菌生长缓慢, 约需三个月才能长成明显的菌落。菌落点状, 直径一般小于 1mm 。培养初期无色或淡肉色, 长期培养后呈巧克力棕或丁香棕。无气生菌丝, 基内菌丝长在固体培养基表层或浅层。可以斜面保存。微量好气, 在液体培养基中以静止培养生长较好。在 CMS-3 号、CMS-2 号、QMOD 等培养基和无氮培养基上可以缓慢生长, 但生长较差。该菌株比较特殊, 至今尚未能摸索出一种适于它生长的培养基。

讨 论

用组织培养法分离的 5 株内生菌, 与目前已知的各弗兰克氏菌菌株相比, 大都比较好气, 菌体颜色较深, 多呈橙、红色, 可以在多种简单的有机或合成培养基上生长。尤其是 EA118 菌株和 HR104 菌株, 不仅生长速度比较快, 对寄主的侵染能力也比较强。将来在实际生产中, 可能具有一定应用价值。

就其分类学特征而言, 前 4 株菌的培养特征和一些生理生化特征各有异同, 并与目前国外所研究的一些弗兰克氏菌株有某些差别。特别是细胞壁为 II 型, 而国外所分离的大量菌株均为 III 型^[9]。这在弗兰克氏菌的分类学研究方面, 无疑将具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 701—706, 1974.
- [2] Callahan, D. et al.: *Science*, **199**: 899—902, 1978.
- [3] Alan, H. Gibson and William, E. Newton: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981.
- [4] 蒋建德等: *微生物学报*, **24**(1): 37—40, 1984.
- [5] 杜大至等: *微生物学报*, **24**(1): 41—45, 1984.
- [6] 杜大至、王毅岩: *微生物学报*, **23**(4): 347—350, 1983.
- [7] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组: *链霉菌鉴定手册*, 科学出版社, 北京, 1978。
- [8] 阮继生: *放线菌分类基础*, 科学出版社, 北京, 1977。
- [9] M. P. Lechevalier et al.: *Presented at the Fifth International Symposium on Actinomycetes Biology*, 1982.