



Frankia 内生菌的一种分离方法

袁长芳 郝家骐 周鸿宾 龚 彬

(山西生物研究所,太原)

1978年, Callahan^[1] 等人用酶解法首次从香蕨木中分离出 *Frankia* sp. Cpl₁ 菌株,非豆科根瘤内生菌的分离工作进入了一个新阶段,形成纯培养的菌株日渐增加,分离方法日趋多样。目前,比较成功的方法有蔗糖梯度法、系列稀释法、选择培养法及四氧化铁法^[2]。我国杜大至^[3], 杨慧凡^[4] 等人也先后用上述方法从沙棘根瘤中获得纯培养菌株。

本文介绍了用根瘤切片液体培养法,从沙棘根瘤中获得了多株纯培养菌株,并对典型菌株 Hrf₁₈ 进行了培养及其形态特征的观察,同时进行了纯培养菌株固氮活性的测定及回接宿主试验,结果报道如下。

材 料 和 方 法

(一) 沙棘根瘤

沙棘根瘤于1983年11月采自太原西山。

(二) 分离方法

将采集的新鲜根瘤,先用水洗去表面泥沙,再扮成单个瘤突,于自来水中冲洗半小时,以下操作转入无菌条件下进行。取瘤突用滤纸吸去表面水分,投入95%酒精中灭菌5分钟,再转入0.1% HgCl₂ 中灭菌5分钟,然后用无菌水冲洗多次,逐个将瘤突接种到盛有5 ml 肉汤培养液试管中,30℃培养两星期,约有半数试管被细菌和其它菌污染。取无污染试管中的根瘤用无菌水冲洗两次,置于无菌平皿中,将根瘤切成薄片,取瘤片逐个接入盛有15 ml QMod^[5] 培养液的试管(15 × 180 mm)中,每管一片,置试管于28℃温箱中培养,一个月左右,陆续在发黑的根瘤切片上长出白色的菌落,涂片镜检,排除类似内生菌的污染菌株,最后获得其内生菌纯培养菌落,在不污染的试管中,有半数以上的试管

中长出生内生菌,成功率达50%以上。

(三) 菌株的扩大培养及观察方法

在瘤片上长出的菌落生长缓慢,连续传代,生长则加速。第一次传代时,小心地从瘤片上取下菌落,将它夹成碎块,转接入3—4个盛有15 ml QMod 培养液的50 ml 三角瓶中,培养两周,将菌落研磨,转接到新的培养液中,菌很快繁殖开来。

取菌落于载玻片上风干,用1% 刚果红染色一分钟,吸去染液,干后加一滴盐酸酒精液,风干即可镜检。

电镜制片,参照 W. Newcomb^[6] 等人的方法进行,于JSM-35C 型扫描电镜中观察。

(四) 培养液

试验中所用培养液有 QMod^[6] 培养液。肉汤培养液:即一般细菌培养基成份。限定营养培养液^[7]。水培液:用1/2 Hogland's^[8] 营养液配方,用于宿主植物无菌实生苗培养,回接内生菌后,其氮源用量减半。

(五) 回接试验及形成根瘤的活性测定

将菌的培养液离心收集菌体,用无菌水洗涂3次,最后将菌体研磨制成菌悬液,浸泡沙棘实生苗根部半小时后,继续进行水培养,观察结瘤。

结瘤后实生苗培养一个月,剪取根瘤,称重,放入(15 × 180 mm)试管中,密封后注入2 ml 乙炔气体,30℃反应一小时,取试管中气体样品100 μl 进岛津 GC-5AP 型气相色谱仪中定量测定乙烯生成量,表示根瘤的固氮活性。

结 果 与 讨 论

(一) 瘤片液体培养法的分离结果

用瘤片液体培养法共接种瘤片150片,在

150 支试管中被细菌污染的有 46 支, 占总数 30%, 被霉菌污染的有 32 支, 占总数 21%, 在 72 支无污染试管中, 一个月左右先后生长内生菌菌落的有 41 支, 占无污染试管数的 58%。

(二) 分离菌株的形态观察

最早长出的菌附着在瘤片上, 呈白色, 圆形, 传代后, 在 QMod 培养液中生长的菌落, 沉于试管或三角瓶底部, 但不附着于器壁, 菌落呈球形, 菌丝体相互缠绕紧密, 生长初期为白色, 培养一个月后则变为桔黄色, 大小不等, 一般菌落直径 2mm 左右。

取菌落涂片观察, 具典型的内生菌结构形态, 菌丝粗细不匀、其上多数膨大, 有分枝和横隔, 直径 0.7—1.8 μ m (图 1)。孢囊顶生或间生,

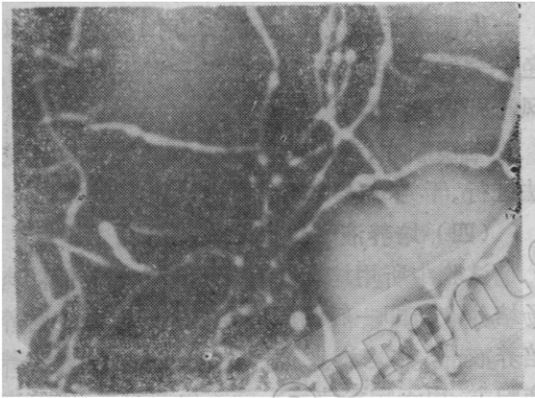


图 1 HRI₃₃ 菌株菌丝体光学显微镜照片 (×1100)

着生于孢囊梗上, 年幼孢囊呈圆形、梨形或棒状, 随发育而发生变化, 成熟孢囊多圆形 (图 2)。孢囊成熟释放出大量孢子。在 QMod 中培养可见少数圆形孢囊。在限定营养的培养液中生长, 形成多数孢囊, 培养 7 天后测定其固氮活性 (乙炔还原), 最高可达 139.34n mol C₂H₄/15ml 培养液·天, 大量孢囊在这种无氮源培养液中诱导形成, 说明孢囊的作用是固氮。

(三) 回接试验与形成根瘤的固氮活性

在 Hogland 水培养液中生长的无菌实生苗, 根部发育较好时, 任何时间都可进行回接, 用纯培养内生菌悬液浸泡根部后, 10 天即出现根瘤, 根瘤生长一个月, 测定固氮活性。用 HRI₃₃ 菌株所回接形成根瘤的固氮活性 (乙炔还原) 达

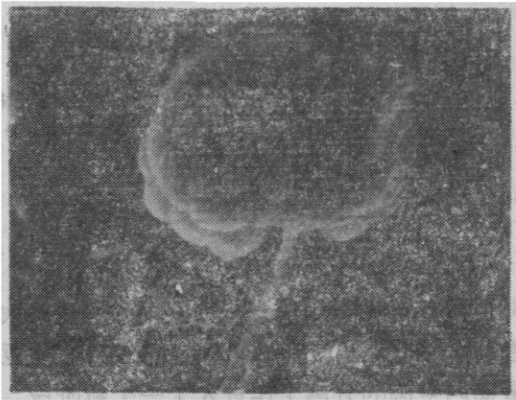


图 2 HRI₃₃ 菌株孢囊的扫描电镜照片 (×6000)



图 3 HRI₃₃ 菌株回接原宿主植物所形成的根瘤

470.4n mol C₂H₄/h.g 根瘤鲜重。形成的根瘤见图 3。

根瘤切片液体培养法分离内生菌, 具有分离速度快, 成功率高, 操作简便, 观察容易等优点, 分离的菌落如能转入适宜培养液中, 能迅速扩大繁殖。本方法同样适用于其它非豆科根瘤内生菌的分离, 成功率亦很高。

参 考 文 献

[1] Callaham, D. et al.: *Science* **199**: 899—902, 1978.
[2] Diem, H. G.: *Can. J. Microbiol.*, **28**: 526—530, 1982.
[3] 杜大至等: *微生物学报*, **24**(1): 41—45, 1984.
[4] 杨慧凡等: *微生物学报*, **24**(4): 315—319, 1984.
[5] Newcomb, W. et al.: *Bot. Gaz.*, **140**(Suppl): 22—24, 1979.

[6] Lalonde, M. and E. H. Calvert: In Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests (ed. by Gordon, J. C. et al.), Oregon State University Press, pp. 95—110, 1979.

[7] Tjepkema, J. D. et al.: *Nature*, **287**: 633—635, 1980.

[8] Murshige, T. and F. Skoog: *Physiol. Plant*, **15**: 473, 1962.