

# 非豆科植物根瘤放线菌研究进展

吴清平 周小燕 蔡芷荷 张华云 张菊梅

(广东省微生物研究所, 广州 510070)

## 1 放线菌根瘤的研究概况

木本双子叶植物根瘤并不像豆科植物根瘤那样为人们所熟悉,它是土壤放线菌与各类木本双子叶植物根系之间共生,形成具有固氮作用的瘤状物<sup>[1]</sup>。为了使这些植物与结瘤的豆科植物相区别,人们先是把这些植物称之为非豆科植物,后来又称为放线菌结瘤植物,以示与细菌诱导产生根瘤的豆科植物相区别<sup>[2]</sup>。在自然界氮循环中,非豆科植物放线菌根瘤的固氮作用起着重要的作用,就固氮量来说,它是生物固定大气氮的最大来源之一,和豆科植物共生作用不相上下<sup>[1]</sup>。

早在 1829 年,在植物学文献上就有欧洲赤杨(*Alnus glutinosa*)根瘤的记载,这种根瘤具有

固氮作用的证据是 1896 年由 Hilterner 所提供的,但直到第二次世界大战后才真正引起人们的兴趣<sup>[3]</sup>。目前世界上已报道在 8 科 24 属中约 200 多种植物有土壤放线菌诱导结瘤的固氮作用<sup>[4]</sup>。在根瘤放线菌还未分离成功前,人们对放线菌根瘤基本上只限于形态及解剖结构的研究,这正是我们对这类共生关系和其重要性的深入认识受到限制的关键因素<sup>[1]</sup>。1978 年美国的 Callaham 等<sup>[5]</sup>采用酶消化法首次从香蕨木(*Comptonia peregrina*)根瘤中成功地分离出了根瘤放线菌,并完成了 Koch 氏法则的检验。从此,人们在这方面的研究出现了飞跃的

---

1995-05-15收稿

发展。截至最近,世界各国已相继从桉木属 (*Alnus*)、胡颓子属 (*Elaeagnus*)、沙棘属 (*Hippophae*)、杨梅属 (*Myrica*)、木麻黄属 (*Casuarina*)、香蕨木属 (*Comptonia*)、潘而希属 (*Purshia*)、腊质果属 (*Colletia*) 及美洲茶属 (*Ceanothus*) 等 9 个属的植物根瘤中成功地分离出了根瘤放线菌(亦有人称它为根瘤内生菌)<sup>[5~11]</sup>,不但对根瘤和放线菌的形态特征做了大量详细的观察,而且对放线菌的生理生化特性及生物学特性等方面进行了比较深入的研究<sup>[12~18]</sup>。

## 2 放线菌根瘤的形态及解剖特征

土壤放线菌诱导非豆科植物产生的根瘤在形态学和解剖学上不同于细菌诱导豆科植物所产生的根瘤。这些典型的根瘤是由于饰变的侧根被感染部位受到局部刺激而产生的,这些饰变的侧根变短,反复地分枝,形成一种大致球形的集团,直径可大至几个 cm。虽然不同非豆科植物放线菌根瘤其形态有异,但总的来说可划分为两种类型:第一种为桉木型,具有多结的珊瑚状结构;第二种为杨梅型,其根瘤每一个末端裂片产生一个大致垂直向上生长的有限瘤根。在基部膨胀的裂片内,放线菌占据专一的几层皮层细胞,在那里出现催化大气氮固定和通过一系列还原作用把它转化成氨的固氮酶<sup>[1]</sup>。1984年,谢卿楣等<sup>[12]</sup>发现木麻黄成熟根瘤内部构造与根的初生构造相似,外层是表皮细胞,具有顶生的分生组织和维管束,内生菌存在于皮层薄壁细胞中,部分感染细胞产生大量的多角细胞(类菌体)。多年生衰老的根瘤瓣最外层具有周皮,皮层细胞中部分含类菌体的细胞破裂,类菌体释放后成为空洞,与根不同的在于根瘤瓣顶端没有根冠和根毛。

## 3 根瘤放线菌的分离培养和保藏方法

1910年 Peklo 通过研究,宣布从桉木属根瘤中成功地分离培养了放线菌,但把它们回接到供试植物上时,却很少能引起结瘤。因此,直到 1978 年前,一般认为非豆科植物的根瘤放线菌的分离和常规培养并未成功<sup>[1]</sup>。1978年 Callaham 等<sup>[5]</sup>采用酶消化法首次从香蕨木的

根瘤中分离出放线菌,常规培养后,回接到寄主幼苗根系,成功地获得了再感染,并观测到高水平的乙炔还原作用,证明形成了有效的根瘤,同时从再感染的根瘤中又成功地分离出同一放线菌。Lalonde<sup>[19]</sup>通过对纯培养的根瘤放线菌进行免疫学及超微结构的研究,证实了 Callaham 等所分离的放线菌具有感染性。此后,在 Callaham 等的基础上发展起来的分离培养方法日趋多样,由繁琐变为简单,成功率愈来愈高。迄今,在分离培养中较为成功的方法计有酶消化法、显微解剖法、蔗糖密度梯度离心法、系列稀释法和组织分离法等 5 种<sup>[5,8~11]</sup>。蒋建德等<sup>[8]</sup>对一些分离培养方法进行了比较分析,指出酶消化法对根瘤切片进行的酶处理,并非分离培养的关键之所在,只是有利于内生菌从宿主细胞中释放出来,而合理地选用表面消毒剂 and 消毒时间乃是影响分离培养成败的至关重要的因素。杜大至等<sup>[13]</sup>以沙棘 (*H. rhamnoides*) 根瘤为材料,在前人基础上建立起来的组织分离法,虽然周期较长,分离机率还不够高,但与目前国际上所采用的各种方法相比,在试验程序、方法及设备等方面都比较简单。因此,可以认为这是一种分离根瘤内生菌的有效方法。

Callaham 等<sup>[5]</sup>采用酶消化法,利用 M-3 和 B-D 培养基,用 Parafilm 封口,在 25℃ 下黑暗中培养,实现了香蕨木根瘤放线菌的成功分离。Baker 等<sup>[10]</sup>采用蔗糖密度梯度离心法,利用酵母抽提物培养基,用 Parafilm 封口,置 28℃ 下培养,成功地分离出牛奶子 (*E. umbellata*) 和美洲绿桉木 (*A. crispa*) 的根瘤放线菌。同年, Lalonde 等<sup>[7]</sup>采用 QMOD 培养基,又成功地分离出桉木 (*A. sp.*) 的根瘤放线菌。杜大至等<sup>[9]</sup>采用组织分离法,利用修改的 MS 培养基,实现了沙棘根瘤放线菌的分离培养。由于 QMOD 培养基配方简单、制作容易、成功率较高,因此,迄今许多研究者均争相采用 QMOD 固体或液体培养基,用于分离培养根瘤放线菌,并且都获得了较好的效果。由于根瘤放线菌的生长较慢,因此,为了加速它们的生

长,很多研究者都在筛选能加速它们生长的培养基,但进展不大。有关研究表明<sup>[5,7,8,10,11]</sup>,根瘤放线菌的适宜生长温度为25~33℃,较理想的温度为30℃左右,低于20℃或高于37℃均对菌生长不利。培养基的适宜pH范围为6.5~7.5,较理想的pH值为7.0左右,低于5.0或高于8.0均对菌生长不利。

随着根瘤放线菌的纯培养物在不断增加,因此,其菌种保藏就成为必需探讨的课题。1994年苏凤岩等<sup>[18]</sup>通过比较无氮液体保藏法、有氮液体保藏法、冷冻干燥保藏法和砂管保藏法等4种方法,发现无氮液体保藏法保藏的菌株,菌体细胞生长速度快,固氮活性强,有侵染结瘤能力,而且该方法不需要设备即可达到保藏目的,简单易行,能使供试菌保藏6年,具有较好的实用价值。

#### 4 根瘤放线菌的回接和感染过程

随着根瘤放线菌的分离培养成功,Callaham等将首次分离的纯培养物,采用砂培法接种于原来的寄主幼苗根系上,供给植株以无氮的Hoagland营养液,四星期后检查到有根瘤的存在;而采用气培法接种后,8天以后,就观察到有结瘤现象。此后,Baker等<sup>[10]</sup>利用纯培养的牛奶子与美洲绿椴木的根瘤放线菌,采用水培法回接于培养在Hoagland营养液中的寄主幼苗,四个星期后检查,发现了许多年幼的根瘤。由于采用砂培法接种,在观察检查时,容易使植株的根系受到损伤,因而影响试验的准确性,因此,许多研究者均乐于采用易于控制条件,便于观察结瘤的水培法来进行接种研究,植株常用的水培液有无氮Hoagland营养液和Sideris-Young营养液<sup>[8]</sup>两种。Perinet等<sup>[20]</sup>采用组织培养方法,在试管中培养出欧洲赤杨幼苗,然后用欧洲赤杨根瘤放线菌纯培养物接种获得成功。这为理论上研究接种方法、条件及观察侵染过程提供了一条新的途径。通常,回接后只要把生长条件控制在寄主适宜范围内,提高光照强度,降低培养基质的铵态氮含量,并使其酸碱度控制在pH7.0左右,尽量使条件有利于根瘤放线菌的侵染和寄主的生长发

育,就可使接种最为有效。

根瘤放线菌一般认为是菌丝以渗透的方式,通过细胞壁进入细胞,从根毛侵入寄主,造成被侵染的细胞膨大和不断分裂而形成根瘤<sup>[11]</sup>。Becking认为根瘤放线菌与豆科植物根瘤细菌一样,也是通过根毛进入寄主细胞,即放线菌经受强大的曲折而形成一种“激素”物质作为媒介,使放线菌与根毛接触后形成侵入线达到皮层,这样使侧根的原基分生组织细胞大量增殖而形成根瘤,被侵染的细胞变大,并且具有巨大的畸形核<sup>[21]</sup>。但谢卿楣等<sup>[12]</sup>则报道,木麻黄根瘤的纵切与横切面都观察到被侵染的皮层薄壁组织普遍变大,细胞充满类菌体,存留的少量细胞质被挤到细胞周边,胞核消失,这与Becking的报告不一致。由于根瘤放线菌的感染过程比较复杂,因此,对其侵入途径和根瘤形成的机制的进一步认识,尚有待于更深入的研究。

#### 5 根瘤放线菌的观察方法及其形态特征

根瘤放线菌的观察方法随观察材料不同而有所不同。对于根瘤放线菌的纯培养物,采用常规方法制片,在普通显微镜和电镜下,即可观察根瘤放线菌的形态特征,如果采用涂片负染法则效果更佳<sup>[11]</sup>。对于根瘤内放线菌的观察,一般采用根瘤切片法制片,在普通显微镜和电镜下观察,但这一方法只能看到放线菌的一些结构特征,却无法看到完整的菌体,这就给认识一些尚未能分离的根瘤放线菌造成很大的局限性<sup>[12]</sup>。1983年杜大至等<sup>[13]</sup>所介绍的根瘤涂片法,就成功地解决了这个问题。目前,这种观察方法已为许多研究者所采用,而在电镜下,亦有人采用涂片负染来观察,其效果极佳。

各种非豆科植物根瘤放线菌,在固体培养基上,菌落一般质地坚硬、致密、半透明、呈放射状生长,无气生菌丝,基内菌丝体发育良好,一般不产生色素;在液体培养基中,底部呈团絮状生长,培养液不混浊,呈微好气性生长;菌丝分枝、有隔,革兰氏染色呈阳性反应;菌丝居间或末端膨大形成特征性的孢子囊,其形状不规则,表面粗糙,破裂释放出孢子后,成为一个皱缩干瘪的空壳;在孢子囊中形成的孢囊孢子,成熟

后,就像石榴籽一样在孢子囊中挤在一起,由于孢子所处的位置不同,其形状亦有差异,但多数是不规则的多面体型,多面体的各面亦不很平整,孢子无鞭毛,不游动;在限制性贫氮培养基上诱导产生的泡囊,着生于较正常菌丝细的柄上,多数侧生于分枝上,球形或纺锤形,其表面非常光滑,一般认为它是放线菌固氮的场所,老的泡囊,会发生皱缩,直至崩溃。人工纯培养的放线菌,在形态上与用根瘤直接涂片所观察到的放线菌极为相似,只是在菌体大小、泡囊形态等方面有一些差异,这可能是由于人工纯培养中,环境条件发生了较大改变的缘故。不同的生长发育条件和不同的培养条件,其形态特征会有所不同,但具原核分隔菌丝、形态多样、产生多面体型孢子的孢子囊及分隔的泡囊乃是根瘤放线菌的典型特征<sup>[5,8~11,13]</sup>。

## 6 根瘤放线菌的分类地位和固氮作用

在《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版<sup>[21]</sup>中,虽曾记载过根瘤放线菌 10 个种,但当时 Becking 只是以寄主的科属名称进行命名。自 1978 年 Callaham 等<sup>[5]</sup>首次从香蕨木根瘤中成功地分离出放线菌以来,世界各国已从 9 个属的非豆科植物根瘤中分离出放线菌,这些根瘤放线菌在形态上非常相似,其主要特征与弗兰克氏菌属所特有的特征相符,而与其它的放线菌则有明显不同,因此,把它们归入了弗兰克氏菌属 (*Frankia*)<sup>[9,17]</sup>。

对于一些高等放线菌来说,其定种原则一般是以形态和培养特征为主,生理生化特性为辅,而对那些较低等的放线菌则主要根据生理生化特性来区别不同的种。虽然弗兰克氏菌不同阶段的发育形态,尤其是泡囊的形态和孢子的分裂方式比较特殊,但用不同分离方法,从不同寄主植物根瘤中分离到的菌株在形态上有何差异,目前尚没有定论,而以培养特征作为定种依据,现在看来也有困难,因为一部分适于固体培养,而另一部分则适于液体培养,这就难于对其培养特征作统一的比较<sup>[9]</sup>。近年来人们又从生理生化特性和遗传学的角度,对弗兰克氏菌展开了大量的研究,以探索不同菌株之间的亲

缘关系来达到定种的目的。目前弗兰克氏菌的定属标准已被公认,但其属内不同种的分类则较为复杂,因此,其定种标准尚未有定论<sup>[4,17]</sup>。

非豆科植物的共生固氮作用大多数是由弗兰克氏菌的侵染形成根瘤所引起的,其中泡囊是弗兰克氏菌在根瘤内的固氮场所,一般位于根瘤的前端,其固氮机制与豆科植物根瘤不同。但有人亦观察到在固氮条件下,仍有大量内生菌不形成泡囊的放线菌根瘤,据此认为泡囊可能并不是这些放线菌固氮的先决条件<sup>[2]</sup>。在自然条件下,放线菌根瘤里面均存在着或多或少的泡囊,但在纯培养条件下,弗兰克氏菌要产生泡囊就需一定的条件;而采用类似条件,放线菌根瘤的固氮活性亦可得到提高。要使纯培养的菌株产生泡囊,就必须采用无氮限定培养基,而用铵盐处理放线菌结瘤植物,泡囊就会出现破坏现象。另外,放线菌根瘤的固氮除必需钼外,还需钴、铜及磷<sup>[15,16]</sup>。

放线菌根瘤及纯培养的根瘤放线菌的固氮活性的测定与豆科植物根瘤及纯培养的根瘤细菌的固氮活性测定相同,均采用外标法,用气相色谱仪测定乙炔还原生成乙烯量来表示<sup>[18,16]</sup>。

## 7 讨论

采用纯培养的菌种接种比直接采用根瘤悬浮液或结瘤植株表土制成的悬浮液接种,其结瘤率要高得多。在自然界中,不少地区放线菌结瘤植物的结瘤情况并不理想,因此要借助人工接种增加宿主植物结瘤的数量。然而,不同根瘤放线菌其固氮活性不同,不同的菌株与寄主的配搭,也会有不同的固氮活性。而且不同的接种方法、接种载体和接种条件亦直接影响到寄主的结瘤数量和固氮活性,因此,在人工接种时,要选择合适的菌株与之配搭,选择合适的接种方法、接种载体和接种条件,使之结瘤最多、固氮活性最大。

根瘤放线菌能够人工纯培养后,一般认为其固氮作用是因为具有泡囊的缘故,但缺乏固氮机制的认识,所以,为了今后使探索提高固氮量的方法时,有比较明确的途径可走,深入地研究根瘤放线菌的固氮机制是十分必要的。

目前,世界各国分离出的根瘤放线菌均属慢生型的菌株,一般从分离到明显可见菌落需要1—3个月的时间,因此,就给基础研究带来相当的困难,特别是不能满足未来的田间应用对弗兰克氏菌的大量需要。所以,加强弗兰克氏菌的分离培养研究工作,更多了解体外培养的最适生长条件,进而采用基因工程的方法来改造这些菌株,以加快研究步伐,已成为十分迫切的问题。

### 参 考 文 献

- [1] Torrey J G. *BioScience*, 1978, **28**: (9): 586~592.
- [2] Akkermans A D L, Hobees F, Roelofsen W, *et al.* In "Advances in nitrogen fixation research", ed. by veeger C, Netherland, 1984. 311~319.
- [3] Bond G. *Ann Rev Plant Physiol*, 1967, **18**: 107~126.
- [4] 邹铎, 弥铁铸, 张忠泽. *微生物学报*, 1994, **34**(1): 310~315.
- [5] Callaham D, Tredici P D, Torrey J G. *Science*, 1978, **199**: 899~902.
- [6] Lalonde M. In: *current perspectives in nitrogen fixation*, ed. by Gibson A, Australia Academy of Science, Canberra, 1981, 296~299.
- [7] Lalonde M. In: *Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests*, ed. by Gordon J C. Forest Research Lab., Oregon State Univ., Corvallis, 1979, 95~110.
- [8] 蒋建德, 杨慧凡, 黄家彬. *微生物学报*, 1984, **24**(1): 37~40.
- [9] 杜大至, 原福虎, 李荣儿. *微生物学报*, 1985, **25**(3): 197~230.
- [10] Baker D, Torrey J G. *Nature*, 1979, **281**: 76~78.
- [11] Diem H G, Gauthier D, Dommergues y. *Can J. Microbiol.* 1982, **28**: 526~530.
- [12] 谢卿楣, 朱配演, 章连钧. *福建林学院学报*, 1984, (1): 21~23.
- [13] 杜大至, 王毅岩. *微生物学报*, 1983, **23**(4): 347~350.
- [14] Gauthier D, Diem H G, Dommergues, y. *Appl and Environ Microbiol.* 1981, **41**(1): 306~308.
- [15] Tjepkema J D. *Nature*, 1980, **287**: 633~635.
- [16] Tjepkema J D, Ormerod W, Torrey J G. *Can J Microbiol.* 1981, **27**: 815~823.
- [17] 石彦林, 阮继生. *微生物学报*, 1992, **32**(2): 133~136.
- [18] 苏凤岩, 张忠泽, 李维光. *微生物学报*, 1994, **34**(2): 148~151.
- [19] Lalonde M. *Can J Bot.* 1978, **56**: 2651~2655.
- [20] Perinet P, Lalonde M. *Plant Sci Lett*, 1983, **29**(1), 9~18.
- [21] Becking J H. In *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th edition, ed. by Buchanan R E, The Williams and wilkins Co., Baltimore, 1974, 701~706.