

研究报告

蒙自桉木根瘤内生菌的分离培养

赵之伟

(云南大学生物系, 昆明 650091)

摘要 从蒙自桉木(*Alnus nepalensis*)根瘤中分离得到4株 *Frankia*, 对其进行了形态学研究, 并对 AnI2 菌株进行了生长曲线测定, 结果表明从蒙自桉木根瘤中分离 *Frankia*, 除所采用的培养基和方法外, 宿主植物所处的生长状态也可能是一个影响分离成败的重要因素; “S”培养基是一种较为理想的分离培养基; 在离体条件下, *Frankia* 生长缓慢, 约 10d 左右达到其生长的稳定期。

关键词 蒙自桉木, 弗兰克氏菌, 形态学, 生长曲线

蒙自桉木(*Alnus nepalensis*)是我国西南地区(尤其是云南)亚热带荒山荒地造林的优良树种。在自然状况下, 蒙自桉木通常在火烧形成的次生裸地或自然生境遭人为破坏后形成的生土上迅速生长^[1], 该树种与 *Frankia* 形成的共生固氮根瘤是其速生, 苗木成活率高的重要保证^[2]。*Frankia* 在蒙自桉木根瘤内不形成孢子囊, 而形成大量的菌丝和泡囊^[3], 这类 *Frankia* 通常被称为 Sp(-)型(根瘤内不形成孢子)的 *Frankia*, 相对于 Sp(+)型(根瘤内形成孢子)的 *Frankia*, Sp(-)型 *Frankia* 更容易从根瘤中分离出来进行离体培养^[4]。作者于 1988 至 1992 年的每年 11 月至次年的 2 月多次采集自然生长的蒙自桉木根瘤进行室内分离, 均未获得成功; 但此时国内外已从桉木属(*Alnus*)的其他种植物根瘤中分离到 *Frankia* 的多株纯培养^[5]。1993 年 7 至 8 月, 作者再次于昆明西郊筇竹寺采集蒙自桉木根瘤进行分离培养, 从中分离得到了 4 株 *Frankia*, 并进一步对其进行了形态学研究和生长曲线测定, 现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料来源

蒙自桉木根瘤采自昆明西郊筇竹寺自然生长的蒙自桉木植株。

1.2 材料处理

1.2.1 *Frankia* 的分离培养和形态学观察: 洗净的鲜瘤用 0.1% 升汞做表面消毒后, 用切片法无

菌操作切成薄片, 分别装入内装 5ml 液体培养基(分别为“S”^[6]、“ST”^[6]、“Qmod”^[7]和“YD”^[8]培养基)的小试管(15×150mm)中, 每管一片, 28℃ 静置培养。约一个月左右长出菌球, 菌球连同培养液经玻璃匀浆器匀浆处理后进一步扩大培养于“S”液体培养基中, 培养 20d 后, 挑取培养物做甘油封片进行显微观察并拍照(微分干涉差); 扫描电镜观察时, 培养物经离心(2500r/min, 10min, 以下的离心条件与此相同)收集菌体, 用 25mmol/L (pH7.4) 磷酸缓冲液洗涤两次, 3% 戊二醛固定(单固定), 脱水蒸金后, 用 Cambridge-250 型扫描电镜观察拍照。

1.2.2 *Frankia* 的生长曲线测定: 在 25ml “S”液体培养基中培养了 23d 的培养物 *Frankia* sp. AnI2, 离心收集菌体(湿体积约为 1ml), 加 10ml “S”培养基于玻璃匀浆器中匀浆制成菌悬液, 将此菌悬液倒入 200ml “S”液体培养基中, 用无菌吸管将接过的培养基分装于 15×150mm 的小试管中, 每管 5ml, 共 40 支, 28℃ 静置培养。

以接种后尚未培养为零时刻, 分别取培养 3, 7, 10, 14, 17, 20, 23 和 26d 的试管各两支, 离心收集菌体, 并用生理盐水洗涤三次, 菌体用 0.6mol/L NaOH 水解^[9]; 以牛血清蛋白为标准, 用考马斯亮蓝比色法^[10]测定不同培养时刻

每支试管中的菌体蛋白量,以培养时间 d 为横坐标,菌体蛋白量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 为纵坐标作 AnI2 的生长曲线。

2 结果和讨论

2.1 *Frankia* 的分离培养和形态特征

用切片法从蒙自桉木的根瘤中分离得到的 4 株 *Frankia*, 分别编为 *Frankia* sp. AnI1, *Frankia* sp. AnI2, *Frankia* sp. AnI3 和 *Frankia* sp. AnI4, 其中前三株从“S”培养基中得到, 从“YD”培养基中得到 1 株 (AnI4), 该菌株转到“S”培养基中也能很好生长; “ST”和“Qmod”培养基中未分离到 *Frankia*; 所得到的 4 株菌转到“ST”培养基中均不生长, 说明“S”培养基是一种较为理想的分离培养基, 4 株菌应属于生理 B-型 *Frankia*^[6]。

4 株 *Frankia* 的形态特征: 菌落呈白色, 球形, 结构疏松, 较易用接种针挑取, 不产色素; 在光学显微镜下, 菌丝平展, 分枝, 直径 $0.2\sim 1.2\mu\text{m}$, 培养 14d 后产生大量孢子囊, 孢子囊端生或间生, 球形, 棒形, 花生壳状, 网球拍状等, 大小不等 (图 1-1, 2, 3); 孢子球形至多角形, 直径与菌丝直径相当 (图 1), 在孢子囊内排列不规则, 如石榴籽状 (图 2)。在“S”培养基中无泡囊分化。

从根瘤中分离 *Frankia* 的方法很多^[11~13],

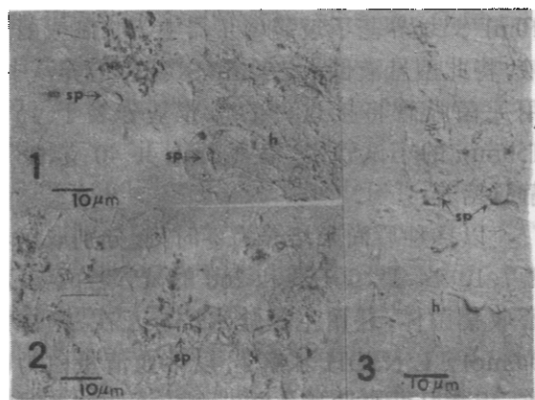


图 1 光学显微镜下的 *Frankia* sp.

示菌丝(h)和孢子囊(sp)

1. AnI1 ($\times 750$); 2. AnI2 ($\times 750$); 3. AnI3 ($\times 800$)

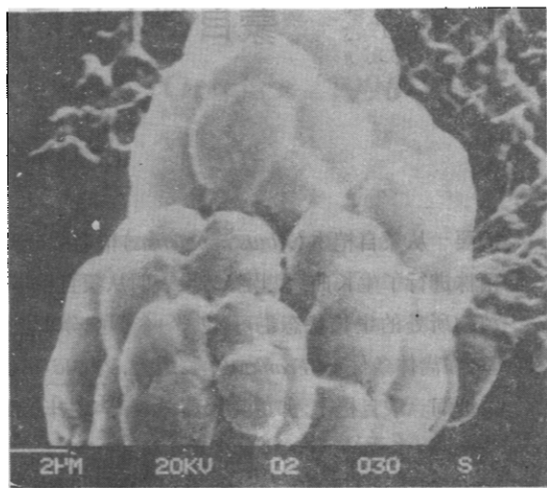


图 2 扫描电镜下 *Frankia* sp.

AnI2 的孢子囊和孢子 ($\times 7500$)

切片法是一种较理想的方法, 它不需要特殊的设备, 只要有一定量的样品处理和实验人员的耐心就可以成功地分离到 *Frankia*。作者在此之前采用此方法和同样的培养基却并未成功, 查其原因, 发现这之前的采样时间恰好是蒙自桉木的落叶休眠期 (11 月至次年 2 月), 而本次研究的采样时间是 7 至 8 月, 蒙自桉木处于生长旺盛季节, 所以, 从根瘤中分离 *Frankia*, 除所用的分离方法和分离培养基外, 宿主植物所处的生长状态可能也是影响分离成功与否的一个重要因子。

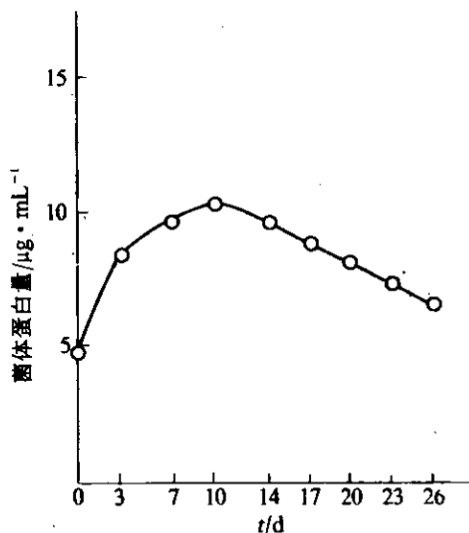


图 3 *Frankia* sp. AnI2 的生长曲线

2.2 *Frankia* sp. An12 的生长曲线

以不同培养时间的菌体蛋白量($\mu\text{g}/\text{ml}$)表示 *Frankia* sp. An12 菌体的生长量的生长曲线图(图3)。

从图3可以看出, *Frankia* sp. An12 生长较为缓慢, 与微生物的典型生长曲线相比, 此生长曲线无延迟期, 对数期维持时间较长(约9d), 但增长斜率较平缓, 倍增时间长, 约3d。10d左右菌体达到最大生长量($10.45\mu\text{g}/\text{ml}$)而进入稳定期, 稳定期维持时间较短, 之后随培养时间延长, 菌体蛋白量递减, 但这种递减与典型生长曲线的衰亡期在本质上有一定区别: 衰亡期曲线的“衰减”是由于微生物的菌体自溶、死亡等因素而造成的整个群体的活菌数下降; 但从理论上讲菌体蛋白仍应是逐渐积累的, 即总生物量应逐渐增加。本研究中生长曲线所出现的菌体蛋白的“衰亡”递减现象, 除菌体(菌丝)的自溶, 其蛋白质被离心洗涤外, 另一个更重要的因素可能是在生长后期, *Frankia* 产生孢子囊和大量的孢子, 孢子在作菌体水解时不易或只有少数被水解, 因而出现了与典型生长曲线相似的衰亡期。

致谢 云南大学生物系91级微生物学专业学生赵志坚和杜丽涛参加了部分实验工作, 特致谢。

参 考 文 献

- [1] 云南植被编写组. 云南植被, 北京: 科学出版社, 1978, 385~388.
- [2] Subba Rao N S. Advance in Agricultural Microbiology, U. K.: Pub. by Oxford and PBH Pub. Co. 1982, 8~14.
- [3] 赵之伟, 张兵, 谢光保. 云南大学学报(自然科学版), 1992, 14(4): 398~400.
- [4] Mary P Lechevallier. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(1): 1~8.
- [5] 王晨光, 宋尚直, 阮继生. 微生物学报, 1993, 34(4): 297~303.
- [6] Lechevallier M P, D Baker, F Horrier. Can J Bot, 1983, 61: 2826~2833.
- [7] Lalonde M. Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests (ed. by Gordon J C), Oregon: Oregon State University Press, 1979, 95~110.
- [8] Baker D, J G Torey. Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests (ed. by Gordon J C), Oregon: Oregon State University Press, 1979, 38~53.
- [9] 丁鉴, 张忠泽, 李忠伟, 等. 微生物学杂志, 1986, 6(2): 33~34.
- [10] Marion M Bradford. Ana Biochem, 1976, 72: 248~254.
- [11] Baker D, G H Kidd, J G Torey. Bot Gaz, 1979, 140(Suppl.): 49~51.
- [12] Baker D, J G Torrey, G H Kidd. Nature, 1979, 281: 76~78.
- [13] 杜大至, 王毅岩, 崔国良. 微生物学报, 1984, 24(1): 41~45.

ISOLATION AND CULTIVATION OF THE ENDOPHYTE *FRANKIA* FROM THE NODULE OF *ALNUS NEPALENSIS*

Zhao Zhiwei

(Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract Four strains of *Frankia* were isolated from the nodules of *Alnus nepalensis*. Morphological study was made on them and the growth curve of *Frankia* sp. An12 was determined in vitro. The results shown that beside the medium and the isolating method, the growth state of the host plant would also be an important influence factor in the successfully isolating *Frankia* from the nodules of *Alnus nepalensis*, “S” medium was a good medium for isolating and cultivating *Frankia*. *Frankia* grown slowly in vitro, it could attain its stationary phase in about 10 days.

Key words *Alnus nepalensis*, *Frankia*, morphology, growth curve