

两株木麻黄内生菌培养条件 和培养特征的比较研究*

康丽华

(中国林业科学研究院热带林业研究所)

关键词 木麻黄; 弗兰克氏菌; 培养条件

自1978年 Callaham 等人首次从香蕨木 (*Comptonia peregrina*) 根瘤中成功地分离出 Frankia 内生菌纯培养后^[1], 许多学者已从赤杨属 (*Alnus*)、胡颓子属 (*Elaeagnus*)、沙棘属 (*Hippophae*)、杨梅属 (*Myrica*) 和木麻黄属 (*Casuarina*) 等非豆科固氮树木根瘤中分离得到 Frankia 内生菌^[2-5]。但这些内生菌生长极其缓慢, 这给大面积的田间应用带来许多困难。因此, 作为 Frankia 菌应用研究的前提, 需要更多地了解体外培养条件及其最适生条件。目前国内外已进行了很多这方面的研究^[6-10]。从已分离的内生菌株形态看, 它们是极其相似的, 都具有 Frankia 的典型特征; 从培养条件看, 也表现出许多共同性, 但又有一些差异^[10]。本文报道了两株木麻黄内生菌培养条件和培养特征的比较结果, 为 Frankia 内生菌应用于生产提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

Frankia 86001、86002 两菌株分别从福建东山赤湖林场和海南省岛东林场的普通木麻黄 (*Casuarina equisetifolia*) 根瘤中分离获得^[9]。

1.2 培养方法

试验全部采用液体培养, 以便于接种和收集菌体。

1.2.1 菌悬液制备 接种液经离心收集菌体, 用无菌蒸馏水洗涤3次后研磨制成菌悬液, 以0.2 ml 的接种量接入盛有7 ml 不同培养液的16 cm × 1.5 cm 试管中, 每组3次重复, 在28~30 °C 下静止培养一个月后, 用双缩脲法测定菌体蛋白质。

1.2.2 培养基 以 Bap^[11] 为基础培养基。在碳源试验中, 去掉基础培养基的碳源丙酸钠, 分别加入浓度为1% 的试验碳源, 经紫外线灭菌1 h 后加入已灭菌的培养基中。在氮源试验中, 去掉基础培养基的氮源 NH₄Cl, 分别加入浓度为0.5% 试验氮源。pH 试验用 Bap 培养基, 分别将 pH 值调至5.5、6.5、7.5、8.5。NaCl 试验用 Bap 培养基, 分别加入0.5%、0.7% 和0.8% 的 NaCl。

本文于1990年6月1日收到。

*本研究是法国资助的 FAO 项目“固氮木本树木改良”的一部分。参加工作的还有姚玉华同志, 广东省微生物研究所莫小英同志指导菌体蛋白质含量的测定, 本文经本所弓明钦副研究员审阅, 在此一并致谢。

2 结果和讨论

2.1 菌株在不同培养基中的生长情况比较

Frankia 86001 和 86002 菌株在 Bap、Bap-N^[12]、Jan Blom^[13]、Qmod^[14]、B/2^[9]、S^[15]、S+T^[15]、葡萄糖天门冬素(GuA)^[16]和蔗糖硝酸盐(YcZ)^[16]液体培养基中的生长情况见表 1。

表 1 菌株在不同培养液中的生长情况

菌株	Bap	Bap-N	Jan Blom	Qmod	B/2	S	S+T	GuA	YcZ
86001	卅	卅	+	+	+	++	+	-	-
86002	卅	卅	++	+	卅	++	++	+	+

注: 卅表示生长极明显; ++表示生长明显; +表示稍有生长; -表示不生长。

从表 1 中可见, 86001 和 86002 菌株在多数培养基上生长情况基本一致, 在 Bap 和 Bap-N 培养液中生长极好, 在 Jan Blom、Qmod、S、S+T 上生长次之。86001 菌株在 GuA 和 YcZ 培养液中不生长, 而 86002 菌株在上述培养液中均可生长。

这两株菌在不同培养液中的培养特征也基本一致。在 Bap 和 Bap-N 培养液中, 菌落呈圆球形颗粒状沉淀, 直径约为 0.5~2 mm, 呈荔肉白色; 在显微镜下观察, 可见到菌体形成很多形态各异的孢子囊, 多呈圆形、椭圆形、草莓形、棒状形和穗形等, 或呈不规则形状。在无氮的 Bap 培养液中菌体形成很多泡囊(Vesicles), 多呈球形和卵圆形, 表面光滑, 多着生在菌丝体一侧的细小分枝上, 其直径为 2~3 μm。

2.2 不同碳源对 Frankia 菌株生长的影响

Frankia 86001 和 86002 菌株对不同碳源利用情况见表 2。

表 2 碳源对菌体生长的影响及其培养特征

碳源	86001 菌株			86002 菌株		
	菌体蛋白量 (mg/7ml)	形态	菌体颜色	菌体蛋白量 (mg/7ml)	形态	菌体颜色
吐温 80	0.20	絮状沉淀, 菌丝粗短	荔肉白	0.13	絮状沉淀	荔肉白
丙酸钠	0.58	颗粒状沉淀, 菌丝粗长	荔肉白	0.23	颗粒状沉淀, 菌丝细长	荔肉白
丙酸钠+葡萄糖	0.57	颗粒状沉淀, 菌丝细长	荔肉白	0.12	颗粒状沉淀, 菌丝细长	荔肉白
蔗糖	N.D	颗粒状沉淀	荔肉白	0.10	絮状沉淀, 菌丝较短, 分枝多	落葵淀粉
麦芽糖	N.D	未观察	未观察	0.10	絮状沉淀, 菌丝较短, 分枝多	金叶黄
葡萄糖	N.D	颗粒状沉淀	荔肉白	0.20	絮状沉淀	蜜黄
琥珀酸钠	N.D	未观察	未观察	0.08	絮状沉淀, 菌丝细长	瓜瓢粉
无碳源	—			—		

注: N.D 表示蛋白质含量极微; —表示不生长。

从表2中可见,86001和86002菌株在以丙酸钠为碳源时生长最好,菌体生长量分别是其它碳源的1.15~2.9倍。据报道,从不同属宿主植物中分离的 Frankia 菌株对碳源的利用能力差异很大。从木麻黄根瘤中分离的 Frankia 菌株对丙酸和丙酸钠的利用很好,而从胡颓子、赤杨、香蕨木根瘤中分离的 Frankia 菌株对丙酸和丙酸钠的利用能力却很差,但它们都能很好地利用其它碳源如琥珀酸钠等^[10,17,18]。从表2中也可见,86001和86002菌株在糖类的利用上存在着明显的差异:86001菌株对蔗糖、麦芽糖和葡萄糖利用甚微,但86002菌株却能利用这些糖类,而且菌体颜色在不同的糖类中也发生变化。

2.3 氮源对菌体生长的影响

Frankia 86001和86002菌株对不同氮源利用情况见表3。

表3 菌株利用氮源情况及其培养特征

氮源	86001 菌株			86002 菌株		
	菌体蛋白量 (mg/7ml)	形态	菌体颜色	菌体蛋白量 (mg/7 ml)	形态	菌体颜色
酪蛋白水解物	0.40	絮状沉淀, 菌丝粗长	虾肉白	0.33	絮状沉淀, 菌丝细长	豆汁黄
牛肉膏	0.20	絮状沉淀, 菌丝粗长	荔肉白	0.33	絮状沉淀, 菌丝细长	虾肉白
尿素	0.25	颗粒状沉淀, 菌丝中部多膨大	荔肉白	0.32	絮状沉淀, 菌丝细长	荔肉白
KNO ₃	0.32	颗粒状沉淀, 菌丝粗长, 多孢子囊	荔肉白	0.20	颗粒状沉淀, 菌丝细长	荔肉白
天门冬素	0.33	颗粒状沉淀, 菌丝粗长, 多孢子囊	荔肉白	0.25	絮状沉淀, 菌丝细长	虾肉白
蛋白胨	N.D	未观察	未观察	N.D	未观察	未观察
谷氨酸	N.D	未观察	未观察	N.D	未观察	未观察
NH ₄ Cl	0.42	颗粒状沉淀, 菌丝粗长	荔肉白	0.23	颗粒状沉淀, 菌丝细长	荔肉白
无氮源	0.40	颗粒状沉淀, 菌丝粗长	荔肉白	0.20	颗粒状沉淀, 菌丝细长	荔肉白

从表3中可见,86001和86002菌株能利用多种有机、无机氮源。86001菌株在酪蛋白水解物和 NH₄Cl 为唯一氮源的培养液中生长最好,其菌体蛋白质含量为其它氮源的1.28~2.1倍,在天门冬素、硝酸钾、尿素、牛肉膏培养液中生长次之;86002菌株在以酪蛋白水解物、牛肉膏为唯一氮源的培养液中生长最好,其菌体蛋白量为其它氮源的1.05~1.65倍,在天门冬素、NH₄Cl、KNO₃ 培养液中次之。86001和86002菌株在蛋白胨和谷氨酸为氮源的培养液中生长都极差,而在无氮源的培养液中生长良好,说明此基础培养液是良好的诱导固氮酶。

2.4 pH 值对 Frankia 菌生长的影响

Frankia 86001和86002菌株在不同的 pH 值条件下其生长结果见图1。从图1看出这两株菌生长所能适应的 pH 值范围较宽。当 pH 值5.5~8.5时,菌株均能正常生长,当 pH 值7.5时,菌株生长最好,这与大多数的 Frankia 菌相一致^[7]。

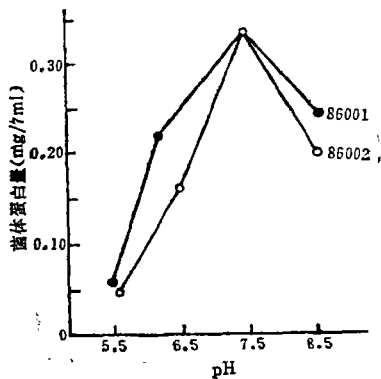


图1 pH值对Frankia 菌生长的影响

2.5 NaCl 浓度对菌株生长的影响

在 Bap 培养基中加入不同浓度的 NaCl, 菌体生长结果见表 4。

从表 4 中可见, 在培养基中加入 NaCl, 对 86001 菌株生长效应是十分显著的, 当培养基浓度为 0.8% 时, 其菌体生长量可提高 50%, 而同样的浓度 86002 菌株只提高 7%。可见, 这两株菌对 NaCl 的反应有明显的差异。在培养基中添加 NaCl 能有效地提高木麻黄内生菌 Frankia 的菌体生长量, 菌株的这种特性可能与宿主植物木麻黄耐盐碱, 生长在海边沙滩上的生活属性有关。

表 4 NaCl 浓度对 Frankia 菌生长的影响

(单位: mg/7ml)

菌 株	NaCl 浓 度			
	0.5 %	0.7 %	0.8 %	对 照
86001	0.43	0.55	0.75	0.42
86002	0.08	0.20	0.33	0.23

3 小 结

Frankia 86001 和 86002 菌株最适合的碳源为丙酸钠, 最适合的 pH 值为 7.5。在培养基添加 NaCl, 能有效地提高其菌体生长量。86001 菌株最适合的氮源为酪蛋白水解物和 NH_4Cl ; 86002 菌株最适合的氮源为酪蛋白水解物和牛肉膏。

参 考 文 献

- [1] Callaham, D. et al., 1978, Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in comptonia, *Science*, 199, 899~902.
- [2] Diem, H. D. et al., 1982, Isolation of Frankia from nodules of *Casuarina equisetifolia*, *Can. J. Microbiol.*, 28: 526~530.
- [3] Diem, H. D. et al., 1983, An effective strain of Frankia from *Casuarina* sp., *Can. J. Bot.*, 61: 2815~2821.
- [4] 蒋建德等, 1984, 由四川桉木根瘤中分离和培养弗兰克氏菌, *微生物学报*, 24(1): 37~40.
- [5] 杨惠凡等, 1984, 沙棘和胡颓子属根瘤放线菌的分离和回接, *微生物学报*, 24(4): 315~319.
- [6] 赵振英等, 1988, 不同非豆科树木科来源的弗兰克氏菌的比较研究, *微生物学报*, 28(3): 279~284.
- [7] 袁长芳, 1987, 辽东桉木根瘤内生菌的分离和培养条件的研究, *微生物学报*, 27(1): 64~68.
- [8] 袁长芳, 1987, 胡颓子属三株根瘤内生菌培养条件的比较研究, *微生物学报*, 27(2): 110~115.
- [9] 康丽华等, 1990, 木麻黄根瘤内生菌的分离、培养和回接, *林业科学研究*, 3(5): 483~486.
- [10] Mary, F. Lopze et al., 1986, A comparison of carbon source utilization for growth and nitrogenase activity in two Frankia isolates, *Can. J. Microbiol.*, 32: 353~358.
- [11] Shipton, W. A. et al., 1982, A comparison of the requirements for various carbon and nitrogen sources and vitamins in some Frankia isolates, *Plant and Soil.*, 69, 149~161.
- [12] Murry, M. A. et al., 1984, Growth kinetics and nitrogenase induction in Frankia sp. HFP-

- Arl3 grown in batch culture, *Plant and Soil.*, 78: 61~78.
- [13] Blom, J. et al., 1980, Growth of Frankia Avcl1 on media containing Tween80 as C-source. *FEMS, Microbiol Letters*, 9, 131~135.
- [14] Lalonde, M. et al., 1979, Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests (ed. by Gordon, J. C. et al), Oregon State University Press, 95~110.
- [15] Lechevalier, M. P. et al, 1983, Physiology, chemistry, serology and infectivity of the two Frankia isolates from *A. incana* sp. *rugosa*, *Can. J. Bot.*, 61: 2826~2835.
- [16] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组, 1975, 链霉菌鉴定手册, 科学出版社。
- [17] Tisa, L. et al., 1983, Studies of growth and morphology of Frankia strains EAN₁pec, Eu₁c, Cp₁ and ACN₁ag, *Can J. Bot.*, 61: 2768~2773.
- [18] Zhang et al., 1986, Culture conditions influencing growth and nitrogen fixation in Frankia sp. HFPCc13 isolated from *Casuarina*, *Plant and Soil.*, 91: 3~15.

*Comparative Studies of Cultural Conditions
and Characteristics of Endophyte
from Nodules of Casuarina*

Kang Lihua

(The Research Institute of Tropical Forestry CAF)

Abstract Two strains of Frankia 86001 and 86002, were isolated from *Casuarina equisetifolia*. Their optimum cultural conditions for growth were tested. The results showed that the optimum medium for Frankia 86001 and 86002 was Bap; the optimum carbon source sodium propionate; the optimum nitrogen source casamino acids and NH₄Cl for Frankia 86001 while for Frankia 86002 it was casamino acids and beef extract. The pH range was similar for both two Frankia strains. The media containing NaCl can promote growth of Frankia 86001 and Frankia 86002.

Key words *Casuarina*; Frankia; cultural condition