

FUJIAN FULANKESHIJUN (FRANKIA) YANJIU

环境博士文库

福建弗兰克氏菌(*Frankia*)研究

ACTINOMYCETES *FRANKIA* IN FUJIAN

李志真 著

中国环境科学出版社



福建弗兰克氏菌 (*Frankia*) 研究

Actinomycetes Frankia in Fujian

李志真 著

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目 (CIP) 数据

福建弗兰克氏菌 (*Frankia*) 研究 / 李志真著. —北京: 中国环境科学出版社, 2006.1

ISBN 7-80209-261-2

I. 福… II. 李… III. 弗兰克氏菌—研究—福建省 IV. Q939.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 003184 号

环境科学与工程出版中心

电话(传真): 010-6711 2735

网 址: www.cesp.cn

电子信箱: sanyecao@cesp.cn

本中心立足于出版环境科学与工程各类专业图书。以服务为宗旨, 以市场为导向。做绿色文明的倡导者, 充当环境文化的传播者。

出版发行 中国环境科学出版社

(100062 北京崇文区广渠门内大街 16 号)

网 址: <http://www.cesp.cn>

联系电话: 010-67112765 (总编室)

发行热线: 010-67125803

印 刷 北京市联华印刷厂
经 销 各地新华书店
版 次 2006 年 1 月第一版
印 次 2006 年 1 月第一次印刷
印 数 1—2 000
开 本 880×1230 1/32
印 张 4.75 彩插 1 页
字 数 130 千字
定 价 19.00 元

【版权所有。未经许可, 请勿翻印、转载, 违者必究】
如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

前 言

农林业的可持续发展与氮素营养密切相关。加大天然氮素的循环利用以减少人工合成化学氮肥用量及其造成的污染,具有重要的现实和长远意义。

生物固氮占地球陆地生态系统中氮资源总量的 70%左右,其中根瘤菌与豆科植物和 *Frankia* 与放线菌结瘤植物是两个最主要的共生结瘤固氮系统^[1, 27]。

Frankia 的大多数能够与放线菌结瘤植物共生固氮,具有跨越科、属、种对宿主植物的侵染和防止固氮受氧损伤的独特机制是根瘤菌所没有的,在扩大生物固氮领域的研究中颇具潜力和前景。早在 1829 年就有 *Frankia* 宿主植物结瘤的记载,并从 1910 年开始了 *Frankia* 的分离研究,但到 1978 年才首次获得其内生菌纯培养,恰好是 1888 年分离出根瘤菌纯培养后的 90 年,因而 *Frankia* 的研究相对而言尚处在起步阶段,有必要加大力度,迎头赶上^[28]。

Frankia 与放线菌结瘤植物共生固氮基本上处在自然条件下的野生状态,面临的迫切科学任务是,掌握其共生结瘤固氮的机理和规律,在人为干预下提高其固氮效率和效益,并扩大侵染宿主和利用范围,以发挥其在农林业可持续发展中的更大作用。

本书是上述研究构思的一部分,着重于在建立福建省 *Frankia* 菌株资源库、掌握生物学特性、了解 *Frankia* 遗传多样性的基础上,

致力于应用试验。筛选了与木麻黄和杨梅共生固氮的优良菌株，应用于育苗造林，取得了较显著的效果，为提高共生固氮效率、扩大生物固氮范围奠定基础。所收集分离的菌株在 *Frankia* 分类及系统发育上的意义，则有待鉴定。

本项研究的初步结果表明，扩大 *Frankia* 的利用是可能和必要的。今后需要通过普查继续掌握菌株资源，了解 *Frankia* 的生物多样性，突出重要果、林树种的专用优良菌株、抗逆性菌株的筛选及其利用技术。扩大 *Frankia* 侵染宿主范围，提高共生固氮效率，探讨 *Frankia* 与非宿主植物的可能作用，有必要促进常规技术与基因工程的结合，以期早日实现目标，更好地服务农林业，造福人类。

摘 要

本书对福建放线菌结瘤植物共生固氮菌弗兰克氏菌 (*Frankia*) 进行了较为系统的研究, 包括以下主要内容及结果。

1. 在福建的东山、厦门、南安、惠安、福清、福州、福鼎、武夷山、来舟、上杭、长汀等 11 个县市 22 个地点, 采集了木麻黄、杨梅、桉木和胡颓子等 4 科 4 属 9 种放线菌结瘤植物根瘤, 分离培养并获得了内生菌 86 株, 经镜检和回接确认为 *Frankia*。对分离获得的菌株进行编号, 引进国内外 *Frankia* 菌株 6 株, 初步建立了 *Frankia* 菌株资源库, 并作了保存实验。这些研究为全面掌握和研发 *Frankia* 资源奠定了基础。在所采集的菌株资源中, 首次采得当地野生种江南桉木在沼泽地生长的根瘤, 具有深入研究价值。

2. 对所分离的 30 余株根瘤内生菌进行了形态、培养、生理、固氮、细胞壁类型、盐分胁迫、宿主特异性以及分子多态性等生物学特性研究。

(1) 参试根瘤内生菌都具有孢囊、泡囊和分枝状菌丝等 *Frankia* 特征性结构。木麻黄菌株 FCc64、FCc92、FCe33 和杨梅菌株 FMr16、FMr43 还具有串珠状菌丝段。木麻黄、桉木根瘤内生菌和杨梅根瘤内生菌在菌丝体大小、孢囊与泡囊形成等方面表现出较明显的差异。绝大多数木麻黄、桉木菌株在缺氮条件下产生丰富的泡囊, 多数杨梅菌株和部分木麻黄、胡颓子菌株在含氮培养基中也能形成泡囊。

(2) 比较了 *Frankia* 菌株在液体和固体培养基中的培养特征。参试木麻黄、桉木、胡颓子菌株在同一培养基中的生长表现较为一致, 随着培养基的改变菌落形态与菌株生长有所变化。杨梅菌株在不同培养基中的菌落形态和色泽呈现出较大差异。参试 *Frankia* 菌株在斜面培养基上主要有四种菌落类型。

(3) 实验将 18 株 *Frankia* 菌株划分为三种生理类群: A 类群 3 株, B 类群 10 株, AB 类群 5 株。在细枝木麻黄和杨梅根瘤内同时存在 A、B、AB 等三种类群的内生菌, 同一株杨梅根瘤内也有 B、AB 等两种生理代谢类群的内生菌共存。

(4) 参试菌株可以利用短链脂肪酸如吐温、乙酸钠、丙酸钠和丙酮酸, 但对单糖、双糖和淀粉等利用不良或不利用, 一些菌株能利用丁二酸钠、苹果酸钠、草酸钠等三羧酸循环的中间产物。参试菌株都能利用酪蛋白水解物, 不利用蛋白胨, 对 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 和牛肉膏的利用存在明显差异。木麻黄 *Frankia* 能较好地利用牛肉膏, 部分菌株可利用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KNO_3 , 杨梅菌株利用 KNO_3 较好, 对 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和牛肉膏的利用较差。桉木 3 个菌株和胡颓子 FEO01 能很好地利用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KNO_3 , 对牛肉膏利用较差。所有参试菌株不产生纤维素酶, 不使明胶液化, 不利用苯丙氨酸, 不产生硫化氢, 能水解尿素, 部分菌株可分解酪素, 还原硝酸盐。实验菌株在斜面培养特征、碳源利用、侵染宿主等方面与国际上相应生理类群的菌株有较大的差异, 表现在: 生理 A 类群菌株不能利用大多数糖类物质, 能够感染宿主植物结瘤; 生理 B 类群菌株多, 可以在斜面培养基上形成菌落, 具有一定的蛋白酶活性。参试 *Frankia* 菌株在碳源氮源利用、代谢酶产生等生理特性方面与其生理类群、宿主来源之间没有明确的对应关系, 反映出福建 *Frankia* 在代谢功能上的多样性。

(5) 参试 *Frankia* 菌株在离体培养下具有固氮酶活性, 且差异显著。

(6) 多数 *Frankia* 菌株细胞壁富含丙氨酸, 胞壁类型为 III 型, 但木麻黄 FCC^{AC}02 和杨梅 FMr16 等 2 个菌株细胞壁丙氨酸含量低, 为细胞壁类型 II。

(7) 木麻黄和桉木 *Frankia* 菌株耐盐性较强, 一些菌株可在 5% NaCl 培养基中生长, 多数杨梅 *Frankia* 对盐分敏感。实验表明 *Frankia* 菌株在逆境代谢上存在着丰富的多样性, 福建省山地和沿海土壤存在着比较丰富的 *Frankia* 抗盐性菌株资源。

(8) 宿主交叉侵染试验结果表明, 福建 *Frankia* 表现出两种宿主特异类群: 木麻黄类群和杨梅-桫欏木类群。侵染木麻黄的 *Frankia* 只来自木麻黄, 杨梅、桫欏木和胡颓子菌株不能感染木麻黄结瘤, 木麻黄菌株可进行种间侵染。杨梅、胡颓子、桫欏木的 *Frankia* 可以相互侵染, 也能使木麻黄结瘤。

(9) 利用 16S-23S rDNA 间隔区 IGS 和 *nifD*-K 基因 IGS 的 PCR-RFLP 分析技术对与木麻黄、杨梅、桫欏木、胡颓子共生 *Frankia* 纯培养和根瘤内生菌进行了分子多态性研究, 结果表明与福建省木麻黄、杨梅、桫欏木共生的 *Frankia* 可以划分为三大类群: 木麻黄类群、杨梅-桫欏木类群和胡颓子类群。与细枝木麻黄、短枝木麻黄、粗枝木麻黄、山神木麻黄共生的 *Frankia* 同源性程度高, 同属于一个类群; 与杨梅、四川桫欏木、江南桫欏木、台湾桫欏木等共生的 *Frankia* 亲缘关系较近, 为另一个类群。在这个类群中, 菌株之间存在较大的差异, 其遗传变异与宿主来源、地理分布没有明确的对应关系。与福建省胡颓子属共生的 *Frankia* 较为独特, 不同于杨梅、木麻黄和桫欏木共生菌。分子多态性分析比宿主特异性试验更能精确地反映 *Frankia* 的遗传差异。

3. 以福建省防风固沙重要树种木麻黄和水土保持树种杨梅为对象, 开展了 *Frankia* 的应用试验。

(1) 温室和圃地接种 *Frankia* 及造林结果表明, 接种 *Frankia* 对木麻黄的生长促进效果是明显的, 提高了木麻黄的苗高、地径、生物量以及植株氮含量, 其中菌株 FCe33 和 FCC90 对短枝木麻黄和细枝木麻黄生长的增益作用好。采用 *Frankia* 双菌株混合接种、*Frankia* 与稻壳炭联合使用、增加接种菌量等方法, 对苗木生长有良好的促进作用。

(2) 接种 *Frankia* 能明显促进杨梅苗期生长, 苗木的苗高、地径、生物量、叶片全氮含量得到显著提高, 增益效果最好的菌株是 FMr59 和 FMr16。研究表明杨梅育苗时采用含 *Frankia* 的土壤或人工接种 *Frankia* 菌株, 可加快苗木早期生长。

(3) 调查了木麻黄新引进树种和种源的苗期生长与结瘤固氮,

结果表明新引进的鸡冠木麻黄、肥木木麻黄和山神木麻黄在福建省亚热带砖红壤地区可结瘤固氮, 滨海木麻黄则不能形成根瘤。不同种源苗期生长、结瘤能力和固氮作用差异极大。苗木生长和结瘤固氮表现良好的种源是细枝木麻黄的 15002, 粗枝木麻黄的 13146、13987, 肥木木麻黄的 13892 和山神木麻黄的 19111。

(4) 开展了 *Frankia* 接种红麻实验, 感染虽未获成功, 但对 *Frankia* 侵染农作物进行了有益的探索。

关键词: 生物固氮 *Frankia* 菌株资源库 生物学特性 应用试验

Abstract

Systematic studies were carried out on *Frankia* strains isolated from the root nodules of actinorhizal plants in Fujian. The main results were as follows.

1. The root nodules were collected from nine species of actinorhizal plants, el *Alnus cremastogyne*, *A. formosana*, *A. traboculosa*, *Casuarina glauca*, *C. equisetifolia*, *C. cunninghamiana*, *Myrica rubra*, *Elaeagnus oldhami* and *E. glabra* which belong to four families of Betulaceae, Casuarinaceae, Elaeagaceae and Myricaceae. These plants distributed in twenty-two sites including coastal sandy site, red soil, yellow soil and mountain swampland in Fujian. Eighty-six isolates were obtained and the nodulation experiment showed that all isolates were infective. The resource bank of *Frankia* strains of Fujian was established and different preservation methods were compared.

2. More than thirty strains were studied on the biological characteristics, including morphology, culture, cell wall chemistry, nutrient utilization, nitrogenase activity, growth under saline stress, host specificity, and DNA molecular polymorphism.

(1) The observations by microscopy demonstrated that all the isolates showed a typical *Frankia* morphology, with filamentous hyphae, multilocular sporangia borne terminally, laterally, or in an intercalary position on branching hypha. Terminal or laterally borne vesicles were formed usually on lack of nitrogen in many isolates from *Alnus*, *Casuarina* and few isolates from *Myrica*. Lots of isolates from *Myrica* and some isolates from *Casuarina*, *Alnus* and *Elaeagnus* also formed vesicles in presence of nitrogen. Variations in hyphal diameter, sporangia and vesicle numbers were noted between media and isolates. The specialized reproductive torulose hyphae were found in some strains such as FCc64,

FCc92, FCc33, FMr16 and FMr43.

(2) Comparison of culture characteristics of isolates in liquid media and on the slant was conducted. *Frankia* isolates from *Casuarina*, *Alnus* and *Elaeagnus* had similar colonial shape, color and pigment in liquid media, whereas some isolates from *Myrica* had different colonial shape and pigment. The colonial shape on the slant was divided into four types.

(3) Eighteen *Frankia* isolates were found to fall into three physiological groups, three isolates were group A, ten were group B and five were group AB. Three group strains were found to coexist in nodules of *C. cunninghamiana* and *M. rubra*, and both B and AB group strains also coexisted in a single tree of *M. rubra*.

(4) All *Frankia* strains utilized short-chain fatty acids such as Tween-80, acetate, propionate, pyruvate and NZ amine, casein, whereas potassium nitrate, sodium benzoate, sodium succinate and sodium citrate were utilized only by some strains. Strains grew poor in presence of monosaccharose, sugar and starch. There were some differences among strains of *Casuarina*, *Alnus*, *Myrica* and *Elaeagnus* when utilizing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 and beef extract. Cellulase, pectinase had not been found in all isolates while proteinase was produced in some strains. All strains could neither utilize phenylalanine nor produce H_2S and hydrolysis pectin, while they could hydrolysis urea. Nitrate reduction and casein hydrolysis was observed in some strains. There was no apparent correlation among physiological groups, host plant origin, and physiological characteristics on utilization of carbon, nitrogen, organic acids and enzyme produced.

(5) Nitrogenase activity of twenty-seven strains was monitored and it varied greatly.

(6) Cell wall type of many *Frankia* strains belonged to type III, except strains FCc02^{Ac} and FMr16 of type II.

(7) Growth of strains under stress of salinity was measured. Nine *Frankia* strains from *Casuarina*, three from *Alnus*, two from *Myrica* had a

tolerance to 5% NaCl. Most of strains from *Myrica* and *Elaeagnus* only grew in low NaCl or without NaCl.

(8) Inoculation of *Frankia* strains on seedlings of *C.cunninghamiana*, *C.equisetifolia*, *C.glauca*, *E.angustifolia*, *H.rhamnoides* and *M.rubra* was conducted to determine the host specificity groups (HSG). The strains from *Casuarina* had a ability to infect not only *Casuarina* but also *A. cremastogym*, *M. rubra*, *E. angustifoli* and *H. rhamnoides*, whereas the strains from *Alnus*, *Myrica* and *Elaeagnus* were found to only infect *A. cremastogym*, *M. rubra* and *E. angustifoli*. So two host specificity groups of strains were divided, one was *Casuarina* group and the other was *Alnus-Myrica-Elaeagnus* group. *Frankia* strains from *Elaeagnus* were found to have more widely infective than those belonged to HSP which Baker established. The results also indicated that *Frankia* in Fujian had sufficient diversity and actinorhizal plants of *Casuarina* had strict specificity than those of *Alnus*, *Myrica* and *Elaeagnus*.

(9) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the PCR amplified 16S-23S rDNA intergenic spacer (IGS) (*rrn* region) and *nif* D-K IGS was made to screen and cluster *Fankia* strains cultured and living in root nodules of *Alnus*, *Casuarina*, *Myrica* and *Elaeagnus*. Twenty-five *Frankia* strains fell into three PCR-RFLP clusters: *Casuarina* clusters, *Alnus-Myrica* clusters and *Elaeagnus* clusters. *Frankia* strains from *A. cremastogym* and *M. rubra* belonged to a closely related PCR-RFLP cluster, whereas strains from *Casuarina* and *Elaeagnus* fell into their own clusters. Results of PCR-RFLP analysis and cross-inoculation indicated that *Frankia* in Fujian had a wide genetic diversity.

3. The *Frankia* inoculation experiments on the seedlings of *Casuarina* and *Myrica* in nursery and in field were conducted, and growth, biomass and nitrogen of seedlings were assessed. Height, diameter of base stem, dry weight and total nitrogen of seedlings increased differently by inoculated with strains. Greatest growth increment was obtained when *Casuarina*

seedlings inoculated with strains FCe33 and FCe90, as well as *Myrica* seedlings inoculated with strains FMr59 and FMe16. Better growth was obtained when plants inoculated with two strains mixed or strains mixed with carbon powder.

4. Growth, nodule formation and nitrogen fixation of different provenances and families of *Casuarina* introduced from Australia were investigated. Nodulation and nitrogen fixation of *C. cristata*, *C. obesa* and *C. collina* introduced into Fujian first was observed in red soil, whereas there was no nodules formed in root of *Allocasuarina littoralis*. There were significant difference in the growth of provenances and families of *Casuarina*. Better growth and high nitrogen fixation were obtained from family 15002 of *C. cunninghamiana*, family 13146 and 13987 of *C. glauca*, family 13892 of *C. obesa* and family 19111 of *C. collina*.

5. Inoculation of *Hibiscus cannabinus* with *Frankia* strains was carried out in the study. Irregular root and low acetylene reduction activity was observed in the treatment of *Frankia* strains and 2,4-D. The results showed that *Frankia* strains were failed to introduce into the root of crop.

Key words: Nitrogen fixation Resource bank of *Frankia* strains
Biological characteristics Application trial

目 录

第 1 章 国内外研究概述	1
1.1 <i>Frankia</i> 的研究意义	1
1.2 <i>Frankia</i> 的研究历史	3
1.3 放线菌结瘤植物的种类与分布	4
1.4 <i>Frankia</i> 分离和回接	8
1.4.1 分离技术	8
1.4.2 菌株回接	9
1.5 <i>Frankia</i> 形态特征	9
1.5.1 形态结构	9
1.5.1.1 菌丝	9
1.5.1.2 孢囊	10
1.5.1.3 孢囊	10
1.5.1.4 串珠状结构的菌丝	10
1.5.2 培养特征	10
1.6 <i>Frankia</i> 生理生化特性	11
1.7 <i>Frankia</i> 细胞化学	13
1.7.1 细胞壁化学组分	13
1.7.2 细胞糖	13
1.7.3 磷酸类脂	13
1.7.4 醌类	14
1.8 <i>Frankia</i> 分类	14
1.9 宿主侵染特性	15
1.10 <i>Frankia</i> 生态	16
1.11 <i>Frankia</i> 分子生物学	18
1.11.1 原生质体技术	18
1.11.2 基因组和 G+C%	18

1.11.3 质粒.....	19
1.11.4 <i>nif</i> 基因.....	19
1.11.5 <i>nod</i> 基因.....	20
1.11.6 <i>glnA</i> 和 <i>glnII</i>	20
1.11.7 rRNA 组成.....	21
1.11.8 分子多态性.....	21
1.12 共生条件下 <i>Frankia</i> 的研究.....	23
1.12.1 侵染方式和根瘤发育.....	23
1.12.2 菌株及宿主对共生效应的影响.....	24
1.12.3 环境因子对结瘤固氮的影响.....	25
1.12.4 多重共生关系.....	26
1.13 <i>Frankia</i> 的应用.....	27
 第 2 章 <i>Frankia</i> 菌株资源库的建立	28
2.1 材料与方法.....	28
2.1.1 材料.....	28
2.1.1.1 放线菌结瘤植物.....	28
2.1.1.2 分离培养基.....	29
2.1.1.3 供试苗木.....	29
2.1.2 方法.....	29
2.1.2.1 根瘤采集.....	29
2.1.2.2 内生菌分离.....	29
2.1.2.3 菌株回接.....	30
2.1.2.4 菌株保存.....	30
2.2 结果与分析.....	31
2.2.1 根瘤采集.....	31
2.2.2 根瘤内生菌的分离.....	31
2.2.3 菌株回接.....	35
2.2.4 菌株保存.....	38

2.3 小结	40
第 3 章 <i>Frankia</i> 生物学特性研究	42
3.1 材料与方法	42
3.1.1 形态观察	42
3.1.2 培养特征	42
3.1.3 生理类群	43
3.1.4 碳源利用	43
3.1.5 有机酸利用	44
3.1.6 氮源利用	44
3.1.7 其他生理实验	44
3.1.8 固氮酶活性	45
3.1.9 细胞壁类型	45
3.1.10 盐分胁迫	45
3.1.11 宿主特异性	45
3.1.12 <i>Frankia</i> 的分子多态性	46
3.1.12.1 供试菌株与植物根瘤	46
3.1.12.2 引物及限制性内切酶	46
3.1.12.3 菌株及根瘤 DNA 的提取	46
3.1.12.4 PCR 扩增	47
3.1.12.5 RFLP 分析	47
3.1.12.6 聚类分析	48
3.2 结果与分析	48
3.2.1 形态特征	48
3.2.1.1 菌丝体	48
3.2.1.2 孢囊	48
3.2.1.3 泡囊	51
3.2.1.4 串珠状菌丝	53
3.2.2 培养特征	54

3.2.2.1 液体培养	54
3.2.2.2 斜面培养	58
3.2.3 生理类群	58
3.2.4 碳源利用	62
3.2.5 有机酸利用	64
3.2.6 氮源利用	66
3.2.7 其他生理反应	68
3.2.8 固氮酶活性	70
3.2.9 细胞壁类型	71
3.2.10 盐分胁迫	72
3.2.11 宿主特异性	74
3.2.12 分子多态性	78
3.2.12.1 <i>Frankia</i> 菌株 16S-23S rDNA 的 IGS PCR-RFLP 分析	78
3.2.12.2 根瘤 <i>Frankia</i> 16S-23S rDNA 的 IGS PCR-RFLP 分析	82
3.2.12.3 <i>Frankia</i> 菌株 nif D-K 的 IGS PCR-RFLP 分析	84
3.3 小结	87
第 4 章 <i>Frankia</i> 的应用试验	90
4.1 材料与方法	90
4.1.1 <i>Frankia</i> 接种木麻黄试验	90
4.1.1.1 温室接种	90
4.1.1.2 苗圃接种和田间造林	91
4.1.2 <i>Frankia</i> 接种杨梅试验	92
4.1.2.1 杨梅自然感染结瘤	92
4.1.2.2 接种苗木	92
4.1.3 木麻黄新引进树种的适应性	92
4.1.4 <i>Frankia</i> 侵染农作物实验	93