

Isolation and Ecological Characteristics Research of *Frankiaceae* in *Elaeagnus angustifolia* L. Root Nodule

Fuqiang Song¹, Lichun Niu¹, Alexander V. Kurakov^{2*}, Wei Chang¹

¹College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin Heilongjiang

²Moscow Lomonosov State University, Moscow, Russia

Email: 0431sfq@163.com, kurakov57@mail.ru

Received: Feb. 14th, 2015; accepted: Feb. 26th, 2015; published: Feb. 27th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

We successfully introduced *E. angustifolia* to conduct biological repairing in soda salinization soil of Heilongjiang Province, China. Resistance of *E. angustifolia* has been greatly improved because of the formation of *Actinomycetes* nodule. In this study, *Actinomycetes* has been separated from *E. angustifolia* nodule by the method of nodules sectioning and identified by the method of molecular biology, which has obtained 2 *Frankia* strains (*Frankia* sp1 and *Frankia* sp2). At the same time, we have obtained one of *Micromonospora* sp. and *Nocardia* sp. *Frankia* sp1 belongs to physiological type A, *Frankia* sp2 belongs to physiological type AB. Both of them showed strong salt tolerance, but *Frankia* sp2 was better than *Frankia* sp1. Two kinds of *Frankia* strain growth maximum at a pH of 7.5. The results enrich the theoretical basis of the research of *E. angustifolia* root nodules.

Keywords

Elaeagnus angustifolia L., Root Nodules, Salinization Stress, *Frankiaceae*, Stain Physiological Type

沙枣根瘤内弗兰克氏菌分离鉴定及生态特性研究

宋福强¹, 牛丽纯¹, Alexander V. Kurakov^{2*}, 常伟¹

*通讯作者。

¹黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨

²莫斯科国立大学生物学, 莫斯科, 俄罗斯

Email: 0431sfq@163.com, kurakov57@mail.ru

收稿日期: 2015年2月14日; 录用日期: 2015年2月26日; 发布日期: 2015年2月27日

摘要

黑龙江省苏打盐碱地在生物治理过程中成功地引种沙枣进行生物修复。由于沙枣能够形成放线菌根瘤, 极大的提高了其抗逆性。本研究采用根瘤切片法对沙枣根瘤内的放线菌进行分离, 并通过分子生物学手段进行鉴定, 共得到两种 *Frankia* (*Frankia* sp1、*Frankia* sp2), 同时还获得了 *Micromonospora* sp. 和 *Nocardia* sp. 各一种; *Frankia* sp1 属于生理A型, 而 *Frankia* sp2 属于生理AB型; *Frankia* sp1 和 *Frankia* sp2 均具有较强的耐盐能力, 且 *Frankia* sp2 优于 *Frankia* sp1; 两种 *Frankia* 在 pH 值为 7.5 时菌株的生长量达到最大。研究结果进一步充实了沙枣根瘤研究的理论基础。

关键词

沙枣, 根瘤, 盐碱胁迫, 弗兰克氏菌, 菌株生理类型

1. 引言

松嫩平原属于干旱-半干旱气候区, 区内现有盐碱化土地 373 万 hm^2 , 是世界上三大片苏打盐碱地集中分布区域之一, 其 pH 值在 8.0 以上, 可分为 NaCO_3 型盐土和 NaHCO_3 型碱土及两者混合型。目前对盐碱地的生态修复是亟待解决的问题, 而植被恢复则是关键[1]。恢复植被的一个途径是通过选择耐盐碱性强的先锋植物, 发挥耐盐碱植物的生物改良作用, 改善土壤环境。

沙枣(*Elaeagnus angustifolia* L.)为胡颓子科(Elaeagnaceae)胡颓子属(*Elaeagnus* L.)落叶乔木或小乔木落叶乔木或小乔木, 在我国主要分布在西北地区 and 内蒙古以及华北西北部。沙枣生活力很强, 具有抗旱、抗风沙、耐盐碱、耐贫瘠等特点, 兼具生态、经济和药用价值, 是我国北方生态脆弱地区造林绿化的一个先锋树种[2]。目前黑龙江省已经将沙枣引入并栽植盐碱地, 试验结果表明该树种能够在黑龙江省重度盐碱地上成活和很好的生长。

沙枣能够形成放线菌根瘤。非豆科植物形成的放线菌根瘤能将空气中的游离氮素固定为植物吸收利用的形式, 从而提高植物的生长势及抗性[3]。本项研究主要是对沙枣根瘤内的弗兰克氏菌分离、鉴定并了解其生理特性, 旨在为进一步揭示沙枣的抗性机理及沙枣根瘤菌剂的开发奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料来源

实验材料采自黑龙江省肇东市肇岳山盐碱地(土样全盐量为 2.65%, pH 9.52, 速效磷 13.9 mg/kg, 碱解氮 69.4 mg/kg, 速效钾 187.5 mg/kg。)栽植 3 年的沙枣苗木根系。在林地内随机选取 10 株沙枣书取样 ($n = 10$)。将沙枣根系一侧土挖开, 剪枝钳将带有根瘤的侧根剪下回实验室后, 根瘤用单层纱布包好流水冲洗 2 h 左右, 待粘土冲掉后, 放入超声波清洗器清洗 2 h 左右, 期间每隔 10 min 更换一次蒸馏水; 待水无浑浊小颗粒时, 用滤纸将根瘤表面水分吸干, 处理期间尽量不要损伤根瘤。

2.2. 沙枣根瘤内弗兰克氏菌的分离与鉴定

2.2.1. 根瘤内弗兰克氏菌的分离

在超净工作台中将根瘤分成单瓣瘤，70%酒精和 0.1% NaHClO 对根瘤小瓣表面灭菌，采用根瘤切片法[4]，利用 BAP 固体平板培养基分离放线菌，于 28℃ 恒温培养 7 d，对培养基菌落纯化。同时用最后一次清洗样品的无菌水涂布相应空白对照培养基平板上，检验消毒情况，以判定分离所得到的菌株是否是根瘤内生菌。每处理重复 10 次。

2.2.2. 菌株的鉴定

采用试剂盒的方法提取菌株 DNA。PCR 反应引物为 1429R，碱基序列为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3'。反应体系为 ddH₂O (17.5 μL)，10 × Ex Taq Buffer(含 Mg²⁺)(2.5 μL)，dNTP(1.5 μL)，DNA 模板(1 μL)，上游引物(1 μL)，下游引物(1 μL)，Ex Taq 酶(0.5 μL)，总体积为 25 μL。

PCR 产物电泳后，采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的基因，然后将其连接转化到大肠杆菌中；大肠杆菌菌液加甘油和 LB 液体培养基混匀封口，送于上海英俊生物技术有限公司进行测序，测得基因序列使用 DNAMAN 软件进行序列拼接，登录 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>，利用 BLAST 程序与 GenBank 中的序列进行同源性检索比对，鉴定菌株。

2.3. 弗兰克氏菌生理类型检测

根据生理类型 Lechevelier 方法划分[5]，将分离纯化到鉴定的菌株分别等量接种于 6 种培养基中(表 1)，28℃ 暗处静置培养，并分别培养 8 周，每 2 周离心收集菌丝体，测干重，实验重复 3 次。

2.4. 弗兰克氏菌耐盐能力的测定

采用 BAP 为基础的培养基，其中分别添加浓度为 1%、2%、3%、4% 的 NaCl，并且以不含的 NaCl 的 BAP 培养基作为对照，将其灭菌后，分别接入等量的菌株，28℃ 暗处静置培养 1 个月，离心收集菌丝体，测干重，实验重复 3 次。

2.5. pH 值对菌株生长的影响

采用 BAP 为基础的培养基，使用 0.1 mol/L H₂SO₄ 和 NaOH 调节培养基的 pH 值，分别制备 pH 值 6.5、7.0、7.5 和 8.0 的 4 种培养基。将 4 种培养基中分别接种等量的菌株，28℃ 暗处静置培养 1 个月，离心收集菌丝体测干重，实验重复 3 次。

3. 结果与分析

3.1. 菌株形态特征及鉴定结果

实验共分离获得 4 个纯菌株，代号分别为 H01、H04、H05 和 H07。将 H01、H04 菌株置于光学显微镜下，观察其菌丝体形态特征(图 1)。菌株具有典型的弗兰克氏菌菌丝体形态：菌丝无色，有明显分枝，

Table 1. The composition of culture medium

表 1. 培养基组成

代号/组成	NAZS	葡萄糖	吐温-80	代号/组成	NAZS	葡萄糖	吐温-80
N	+	-	-	T + N	+	-	0.2%
10N	+	1%	-	T + 10 N	+	1%	0.2%
20N	+	2%	-	T + 20 N	+	2%	0.2%

粗细不均，具有菌丝、孢囊和泡囊等特征性结构。根据国际上公认的弗兰克氏菌属的定义，在形态特征方面的描述为：内生菌纯培养呈放线菌样，在液体培养中产生不动孢子的孢囊，有可能形成泡囊，可以初步断定该菌株属于弗兰克氏菌[6]。

对从沙枣根瘤内分离获得菌株进行 DNA 提取、PCR 扩增及 DNA 测序。将菌株测序数据在 NCBI 上进行同源性比对，选取同源性较高的菌种序列，对培养出的菌种进行生物信息学鉴定。从表 2 的结果可以看出，从沙枣根瘤中成功地分离并鉴定出 3 属 4 种放线菌，其中 *Frankia* 属有两种。

3.2. *Frankia* spp.生理类型检测

Lechevalier 根据弗兰克氏菌能否利用吐温-80 而将其分成了二个亚群：生理 A 型和生理 B 型[7]。生理 A 型菌是培养基中存在吐温-80 的情况下，菌株对葡萄糖的利用受到抑制；生理 B 型菌是培养基中存在吐温-80 的情况下，菌株对葡萄糖的利用得到促进。试验结果(图 2，图 3)得出结论：菌株 H01 在无吐温-80 的培养基中能够利用葡萄糖，生长量较高，但与有吐温-80 存在的培养基对比发现，菌丝体的生长

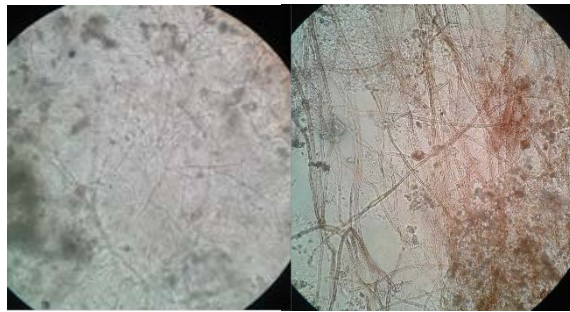


Figure 1. The pictures of mycelium of actinomycetes
图 1. 放线菌菌丝照片

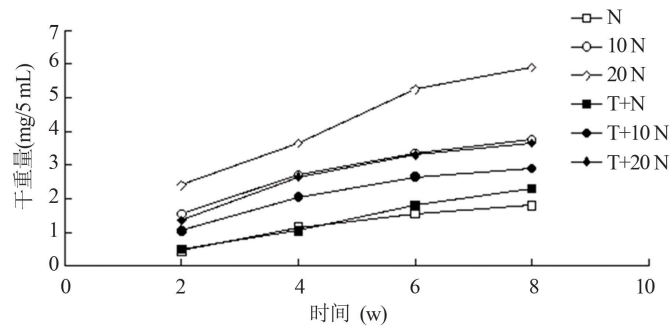


Figure 2. The increment of strains H01 under physiological detection
图 2. 菌株 H01 生理类型在检测中的生长量

Table 2. The BLAST results of actinomycetes
表 2. 分离的放线菌 BLAST 比对结果

类群	菌株编号	序列长度(bp)	最相似菌株	Genbank 登录号	同源性(100%)
放线菌	H01	1494	<i>Frankia</i> sp1.	AJ408870	98%
	H04	1448	<i>Frankia</i> sp2.	AY502036	91%
	H05	1377	<i>Micromonospora</i> sp.	EU414612	94%
	H07	1406	<i>Nocardia</i> sp.	KF731650	91%

量明显降低,所以可将参考菌株 H01 划为生理 A 型。菌株 H04 在有吐温-80 的条件下均可利用葡萄糖,菌丝体的生长量也比较接近,这可以表明 H04 菌株的生理类型既不属 A 型也不属 B 型。根据胡传炯[8]等对弗兰克氏菌的生理类型划分,可将菌株 H04 归为生理 AB 型。

3.3. *Frankia* spp.菌株耐盐能力的测定结果

试验结果图由图 4 可以看出,菌株 H01 和 H04 在不同浓度 NaCl 的培养基中均有生长,1%和 2% NaCl 的培养基中菌体生长与对照组(NaCl 浓度为 0%)几乎一样,菌株生长基本不受影响,说明菌株具有较好的耐盐能力。但从 3%的 NaCl 浓度开始,菌丝体干重随 NaCl 浓度的增加而减少,菌体长势有所下降,菌丝生长状况不良,但仍有一定生长。相比较而言,H04 具有耐盐能力较强。

3.4. pH 值对 *Frankia* spp.菌株生长的影响

试验结果由图 5 可以看出,菌株 H01 和 H04 在 pH 值是 6.5~8.0 的范围内的培养基中,菌体均有生长,其中最适宜菌体生长的 pH 值均在 7.0~7.5 左右,pH 值为 7.5 时菌株的生长量达到最大,当 pH 值高于 7.5 时,菌体长势有所下降,菌丝生长状况不良,但仍有一定生长。pH 8.0 时,菌株 H01 和 H04 耐碱能力基本相同。

4. 讨论与结论

与 *Frankia* spp.结瘤的植物大多为乔木或者灌木,生态分布范围要大于豆科植物,固氮作用强[9]。到目前为止放线菌结瘤植物已达到 7 个目 8 个科 24 个属的 279 个种,这八大科分别是:桦木科(Betulaceae)、

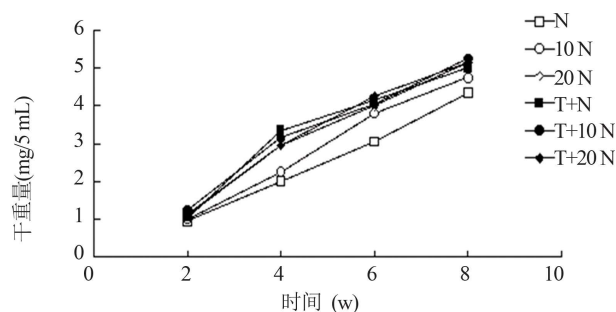


Figure 3. The increment of strains H04 under physiological detection

图 3. 菌株 H04 生理类型在检测中的生长量

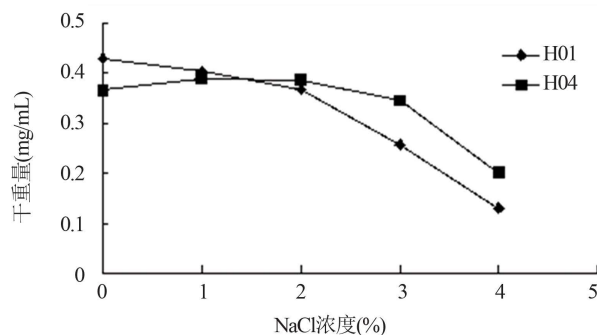


Figure 4. The influence of different concentrations of NaCl on the growth of strain H01 and H04

图 4. 不同浓度 NaCl 对菌株 H01 和菌株 H04 生长量影响

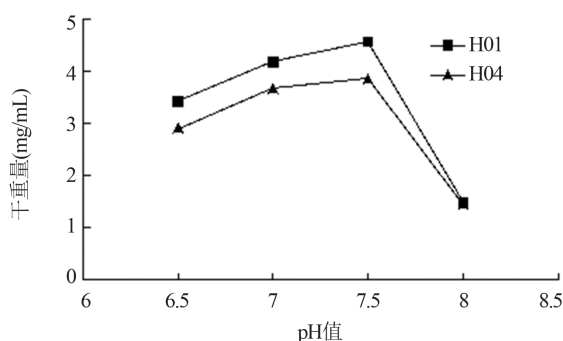


Figure 5. The influence of different pH values on the growth of strain H01 and H04

图 5. 不同 pH 值对菌株 H01 和菌株 H04 生长量的影响

木麻黄科(Casuarinaceae)、鼠李科(Rhamnaceae)、蔷薇科(Rosaceae)、杨梅科(Myricaceae)、马桑科(Coriariaceae)、四数木科(Datisceae)以及胡颓子科(Elaeagnaceae) [10]。目前这 24 个属的放线菌结瘤植物中仍有一大半的属还没有获得纯培养或者得到的纯培养菌种未能回接成功, 因而对弗兰克氏菌的研究还是处在初步的阶段。本研究虽然从沙枣根瘤中成功分离获得两种 *Frankia* spp., 但这两种弗兰克氏菌是否是真正导致根瘤形成的原因, 同时与另外两种非弗兰克氏菌(*Micromonospora* sp.、*Nocardia* sp.)的相互关系均有待于进一步研究。

Frankia spp. 菌株 H01 和 H04 虽然来自同一种寄主, 但菌体形态颜色以及液体培养基中的颜色和浑浊度均不同。经过生理类型的实验得知 H01 菌株为生理 A 型, 而 H04 菌株为生理 AB 型。虽然他们生长时对 pH 值耐性很接近, 但仍可以认为他们是不是同种的菌株。

Frankia spp. 菌株 H01 和 H04 在不同浓度 NaCl 的培养基中均可生长, 1% 和 2% NaCl 的培养基上菌体量与对照组差异不显著, 但从 3% 的 NaCl 浓度开始, 菌丝体的干重随 NaCl 浓度的增加而减少, 菌体长势有所下降, 虽然菌丝生长状况不良, 但仍有一定生长。说明这两株菌株的耐盐能力均较强, 且 H04 菌株优于 H01 菌株。均可在 6.5~8.0 的范围内生存, 其菌体都有一定的生长, 当 pH 间于 7.0~7.5 的 pH 值时, 菌株生长良好, 但低于 6.5 或高于 7.5 时菌株的生长受到抑制, 而且生长量也有所下降。试验结果可以为今后 *Frankia* 的更深入的研究奠定基础。

基金项目

黑龙江省杰出青年科学基金(JC201306); 黑龙江省应用技术与开发计划项目(GC13B502); 哈尔滨市科技创新优秀学科带头人项目(2013RFXXJ056)。

参考文献 (References)

- [1] 孙玉芳, 牛丽纯, 宋福强 (2014) 盐碱土修复方法的研究进展. *世界生态学*, **3**, 30-36.
- [2] 刘正祥, 张华新, 杨秀艳等 (2014) NaCl 胁迫下沙枣幼苗生长和阳离子吸收、运输与分配特性. *生态学报*, **2**, 326-336.
- [3] 熊智, 张忠泽, 姜成林 (2003) 固氮放线菌 *Frankia* 与放线菌根植物共生进化的研究进展. *应用生态学报*, **2**, 213-217.
- [4] Lalonde, M., Calvert, H.E. and Pine, S. (1981) Isolation and use of *Frankia* strains in actinorrhizae formation. In: Gibson, A.H. and Newton, W.E., Eds., *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*, Australian Academy of Sciences, Canberra, 296-299.
- [5] Lechevalier, M.P. (1994) Bacterial. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **44**, 1-8.
- [6] 郝家骥, 朱世琴, 周鸿宾 (1999) 弗兰克氏 Cel517 菌株固氮研究. *山西农业科学*, **1**, 57-59.

- [7] Caporaso, J.G. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, **5**, 335-336.
- [8] 胡传炯, 周平贞 (1997) 一株马桑根瘤内生菌纯培养物的分类鉴定. *微生物学杂志*, **6**, 417-422.
- [9] 刘润进, 田蜜, 刘宁等 (2014) 植物根系复合共生体研究进展. *菌物研究*, **1**, 1-7
- [10] 洪国藩, 宋鸿遇 (1997) 固氮之光. 湖南科学技术出版社, 长沙, 134-169.

汉斯出版社为全球科研工作者搭建开放的网络学术中文交流平台。自2011年创办以来，汉斯一直保持着稳健快速发展。随着国内外知名高校学者的陆续加入，汉斯电子期刊已被450多所大中华地区高校图书馆的电子资源采用，并被中国知网全文收录，被学术界广为认同。

汉斯出版社是国内开源（Open Access）电子期刊模式的先行者，其创办的所有期刊全部开放阅读，即读者可以通过互联网免费获取期刊内容，在非商业性使用的前提下，读者不支付任何费用就可引用、复制、传播期刊的部分或全部内容。

