

## Frankia 菌侵染木麻黄与其共生结瘤程序

张 昕<sup>1</sup>, 沈爱华<sup>2</sup>, 林永敬<sup>1</sup>, 王秋芹<sup>1</sup>, 林海萍<sup>1</sup>

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省林业科学研究院, 浙江 杭州 310023)

**摘要:** 通过回接结瘤后定期制作半薄、超薄切片, 在光学和电子显微镜下观察研究了分离自浙江省短枝木麻黄 *Casuarina equisetifolia* 根瘤的 2 株 *Frankia* 菌的侵染过程。结果表明: *Frankia* 菌从根毛细胞侵入后向内部的皮层细胞延伸, 受 *Frankia* 菌侵入的刺激, 侵染的根毛细胞产生大量电子云密度不等的沉积物。沉积物包裹 *Frankia* 菌继续向内侵染, 形成“侵染线”穿越细胞壁进入邻近细胞, 最终到达根瘤。根瘤产生的时间程序为: 接种 6 d 后 *Frankia* 菌已侵染根部细胞; 接种 12 d 后形成了根瘤原基; 15 d 后根瘤原基的部分薄壁细胞被 *Frankia* 菌侵染后, 转变为前根瘤; 接种 24 d 后前根瘤进一步生长发育伸长, 突出皮层后形成新根瘤并最终发育成成熟瘤。*Frankia* 菌的整个侵染过程为: *Frankia* 菌侵染→形成“侵染线”→形成“界面质”→穿壁→繁殖→孢囊→孢子。根瘤的发育可概括为: 根瘤原基→前根瘤→成熟瘤。图 9 参 20

**关键词:** 森林保护学; 木麻黄; *Frankia* 菌; 侵染; 结瘤程序

中图分类号: S718.83 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2013)05-0669-05

## Infection and nodulation with *Casuarina equisetifolia*-*Frankia* symbiosis

ZHANG Xin<sup>1</sup>, SHEN Aihua<sup>2</sup>, LIN Yongjing<sup>1</sup>, WANG Qiuqin<sup>1</sup>, LIN Haiping<sup>1</sup>

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China;

2. Zhejiang Forestry Academy, Hangzhou 310023, Zhejiang, China)

**Abstract:** Symbiotic nitrogen-fixing *Frankia* strains are well known to promote the growth of *Casuarina* trees in coastal area. The studies on their infection process are very important to utilize them as bioagents. The infection process of two symbiotic *Frankia* strains, isolated from the root nodules of *Casuarina equisetifolia* in Zhejiang Province, was studied using parallel semi-thin and ultra-thin sections that were periodically analyzed with light and electron microscopy. Results showed that *Frankia* penetrated root hair cells and infection proceeded intracellularly in the root cortex. This stimulated infected cells which started producing abundant irregular dense electron deposits. *Frankia*, packaged by deposits, infected continuously, forming “infection threads” that penetrated adjacent cortex cells and ultimately approached nodules. Chronologically, nodule development began when *Frankia* infected root hair cells 6 d after inoculation. At 12 d, after being activated by endogenous hormones, pericycle cells underwent vigorous mitosis giving rise to lobe primordium. At 15 d, when a portion of parenchyma cells were infected by *Frankia*, the primordium transformed into pre-nodules. Finally, 24 d following inoculation, after forming of the apophysis from the cortex, pre-nodules developed into new nodules and finally mature nodules. Thus, *Frankia* infection process consisted of the following processes: *Frankia* infection-“infection thread”-formation of “interfacial matrix”-penetration of cell wall-propagation-vesicles development-spores producing; and the development process for the nodule was primordium-pre-nodule-mature nodule. [Ch, 9 fig. 20 ref.]

**Key words:** forest protection; *Casuarina*; *Frankia*; infection; nodule development

收稿日期: 2012-10-30; 修回日期: 2013-01-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30800878); 浙江省自然科学基金资助项目(Y306095)

作者简介: 张昕, 副教授, 博士, 从事资源微生物与微生物生态学研究。E-mail: zhangxins@126.com

木麻黄 *Casuarina* spp. 作为重要的共生营养型树种, 在防风固沙、防海浪侵蚀以及海岸带生态系统的恢复中发挥重要的作用<sup>[1-2]</sup>。放线菌 *Frankia* 属是木麻黄重要的共生固氮菌, 因它在固定氮素、培肥地力、提高植物生长势和土壤生态修复等方面的独特优势, 自从分离、获得纯培养以来一直是人们研究的目标之一<sup>[3-5]</sup>。目前, *Frankia* 菌的分离和纯培养技术已较为成熟, 并成功地建立起基因组提取和目标基因扩增的分子技术体系<sup>[6-8]</sup>。近年来结瘤基因和结瘤程序逐渐成为研究热点。如 Oureye 等<sup>[9]</sup>将组培技术引入到 *Frankia* 菌结瘤的研究中, 利用室内组织培养研究了木麻黄在不同基质培养基中的长势和结瘤数量。McEwan<sup>[10]</sup>利用荧光显微镜观察了 *Frankia* 菌侵染欧洲桤木 *Alnus glutinosa* 根部的早期过程。Liu 等<sup>[11]</sup>利用超薄切片技术研究了 *Ceanothu* spp. 与 *Frankia* 菌的早期互作和侵染过程。张小民等<sup>[12]</sup>报道了 *Frankia* 菌-沙棘 *Hippophae rhamnoides* 共生体系的侵染和结瘤过程。但迄今为止关于自然条件下 *Frankia* 菌在木麻黄根部共生结瘤程序一直未有报道。浙江省岛屿星罗棋布, 海岸线漫长, 拥有丰富的木麻黄和 *Frankia* 菌资源。作者于 2008-2010 年就省内丰富的木麻黄共生固氮 *Frankia* 菌进行广泛的收集, 选取其中固氮效果较好的 2 株作为供试菌株, 通过定期制作根瘤切片和显微观察还原了外界环境下 *Frankia* 菌在木麻黄根部的侵染、结瘤过程, 以期为菌株的实际开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株和苗木

供试 2 个 *Frankia* 菌株为作者 2008-2010 年分离自浙江省短枝木麻黄 *Casuarina equisetifolia* 上的根瘤, 经验证具有良好的固氮活性, 分别编号为 ZCN113 和 ZCN192<sup>[13-14]</sup>。供试苗木为短枝木麻黄, 购自浙江宁波永丰园林绿化公司, 苗高 15 cm。

### 1.2 回接结瘤

实验于 2011 年 3-6 月在浙江农林大学生物测试中心温室内进行。把供试幼苗移栽至直径 20 cm 的塑料营养钵中, 营养钵中混配体积比 1:1 的沙土和基质, 浇水以使幼苗及时复壮, 1 周后待幼苗成功定植后用于后续试验。供试 2 株 *Frankia* 菌株经 BAP 培养基<sup>[15]</sup>28 ℃静置培养 4 周后用于回接接种试验。菌液离心后收集沉淀, 轻微匀浆后以蒸馏水制备成菌悬液, 用无菌注射器吸 5 mL 菌悬液注射到苗木根系周围土壤, 1 株 *Frankia* 菌接 60 株苗, 以无菌蒸馏水为对照, 该试验隔 20 d 重复 1 次, 共 3 次, 以验证其重复性。接种后隔 3 d 随机选取木麻黄幼苗, 以流水轻轻冲洗取其完整幼根观察结瘤情况, 并就结瘤部位、结瘤数量进行统计, 将已产生的根瘤分别制作超薄和半薄切片, 进行电镜和光镜观察。温室环境控制为白天 28 ℃, 夜晚 25 ℃, 光周期 14 h/10 h, 空气相对湿度 70 %。

### 1.3 显微观察

将上述根瘤用无菌去离子水冲洗干净后切成大小为 1.0 mm<sup>3</sup> 的样品, 立即放入 40.0 g·kg<sup>-1</sup> 戊二醛固定液(用 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液配制, pH 7.2)中 12 h, 磷酸缓冲液清洗 3 次(20 min·次<sup>-1</sup>), 再经 20.0 g·kg<sup>-1</sup> 锇酸固定 4 h, 然后用蒸馏水冲洗 3 次(20 min·次<sup>-1</sup>), 用乙醇逐级脱水并用环氧丙烷过渡 2 次, 然后用环氧树脂包埋, 超薄切片机切片, 切片厚度约 90 nm, 铅盐染色, JEM-1230 型生物用透射电子显微镜观察、摄影。半薄切片的制作是将包埋好的样品切成 0.6 μm 半薄切片, 在万能显微镜下观察拍片。

## 2 结果与分析

### 2.1 根部的结瘤情况

接种 *Frankia* 菌的木麻黄根部根毛与未接菌的对照相比未发现肉眼可见的变化。接种 24 d 后, 根部开始出现近球形根瘤, 根瘤较小, 随着时间延长, 根瘤逐渐增大、数量逐步增加, 到 45 d 左右根瘤数目达到最大, 并不再增加。此时整个根系的根瘤大小不一, 较大根瘤直径为 4 mm, 小的 1 mm 左右。根瘤主要集中在由主根发起的新鲜、细小侧根上。侧根呈毛发状, 多在毛发状的侧根中间形成根瘤, 初期根瘤极小, 在侧根中央略突起, 逐渐成近球形, 透明, 后随着根瘤长大, 逐渐成白色根瘤, 接着颜色加深, 略呈褐色。此外, 根部的根瘤常可聚集生长, 使得结瘤处根部呈念珠状, 少数在端部产生根瘤, 使得根端部呈球形, 或者明显加粗, 根瘤表面光滑, 与其他部位相比根毛稀少, 如图 1。

### 2.2 *Frankia* 菌的侵染过程

接种 3 d 后, 不同菌株接种的木麻黄根部细胞的正常结构都没有发生改变。接种 6 d 后, 光学显微

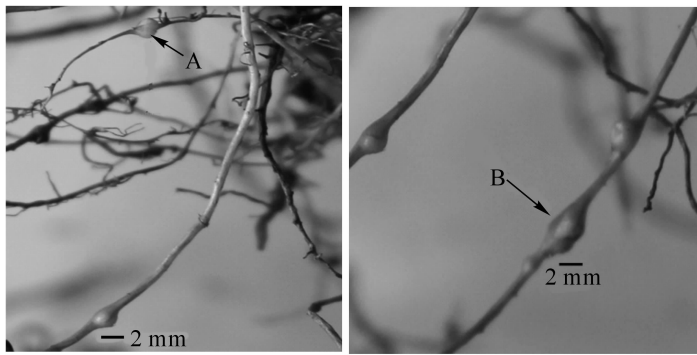


图 1 木麻黄根瘤 (A: 早期幼嫩根瘤; B: 呈念珠状根瘤)  
Figure 1 Root nodules produced by *Casuarina equisetifolia* (A: baby nodules; B: bead-shape nodules)

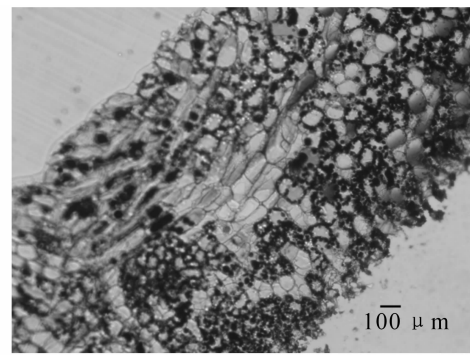


图 2 接种 6 d 后根组织纵截面超薄切片(黑色为侵染细胞)400×  
Figure2 Longitudinal section of root of *Casuarina equisetifolia* 6 d after inoculation (the darken cells were infected, 400×)

镜观察显示 *Frankia* 菌已开始侵染根部细胞(图 2), 被侵染的根毛代谢十分活跃, 胞质内含有丰富的核糖体、高尔基体、线粒体、质体、内质网、微管等以及酚类物质, 并被侵染的根毛发生了代谢方向上的改变, 从侵染位点 2 侧可以看到, 根毛初生壁内侧迅速增厚, 形成了很多不规则的电子密度中等的沉积物(图 3)。在电镜切片上可以明显看到, 由于内生壁的局部加厚而形成管状结构, 这个管状结构将菌体包裹起来, 形成“侵染线”。随着菌体在侵染线内的继续侵入, 在菌体黏液层外很快又被这些新形成的沉积物所包裹, 这些沉积物形成了菌体最外层新的保护结构, 而且随菌体继续侵染, 沉积物在菌体外进一步加厚。这层菌体外的特殊保护结构, 就是“界面质”(interfacial matrix, 图 4)。当侵染菌体接触并进入根毛皮层细胞前, 侵染线前方的皮层细胞早已开始膨大, 转变为传递细胞。传递细胞极度增大, 并在侵染点 2 侧细胞内壁增生, 沉积物增多(图 6)。接种 12 d 后从透射电镜切片还可以看到, 中柱形成层细胞形成了根瘤原基。15 d 后根瘤原基部分薄壁细胞被 *Frankia* 菌侵染后, 转变为前根瘤(图 7), 薄壁细胞中可见明显的菌丝、孢囊和孢子(图 8)。前根瘤进一步生长发育伸长, 突出皮层后形成新根瘤并最终发育成成熟瘤(接种 24 d 后)。 *Frankia* 菌整个侵染过程可总结为: *Frankia* 菌侵染→侵染线→形成“界面质”→穿壁→繁殖→孢囊→孢子。根瘤中的整个生活史为: 根瘤原基→前根瘤→成熟瘤。且在根瘤由小及大的过程中, 切片组织发现木麻黄根系细胞壁出现沉积物, 且有逐步增多的趋势, 细胞壁随之加厚(图 9)。

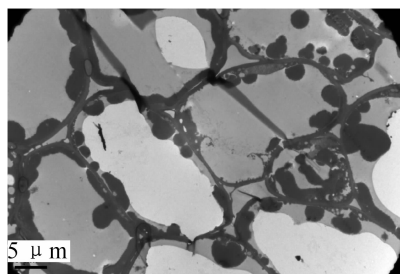


图 3 *Frankia* 菌侵入根毛后, 根毛细胞内形成大量不规则、电子密度中等的沉积物(3 000×)  
Figure 3 Root hair cells produced abundant irregular electron dense deposit after infected by *Frankia*(3 000×)

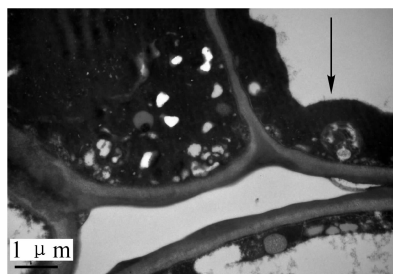


图 4 菌体外的特殊保护结构——“界面质”(20 000×)  
Figure 4 Especial protection structure: “interfacial matrix” packaging *Frankia* strains(20 000×)

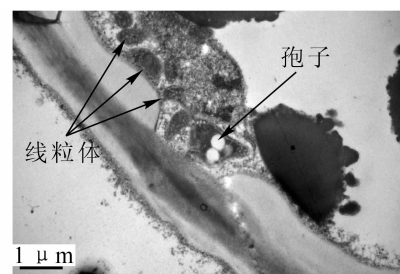


图 5 根毛细胞内大量的线粒体及菌体的孢子  
Figure 5 Abundant mitochondrias and *Frankia* spores in root hair cells

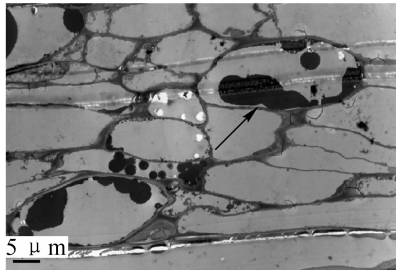


图6 体积增大, 沉积物增多的传递细胞

Figure 6 Enlarging transfer cells with more deposit

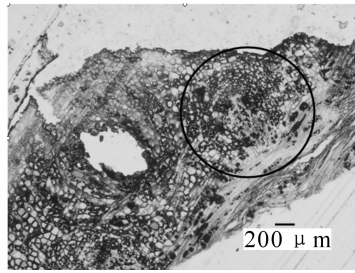


图7 已被 *Frankia* 菌感染的前根瘤(接种 15 d 后, 100×)

Figure 7 Prenodule infected by *Frankia* 15 d after inoculation(100×)

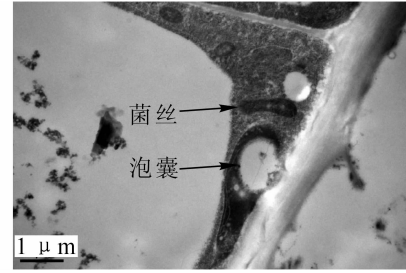


图8 根瘤细胞内 *Frankia* 菌的菌丝和泡囊(图中白色圆形区域, 20 000×)

Figure 8 Hypha and vesicles of *Frankia* inside nodule cell 20 000×)

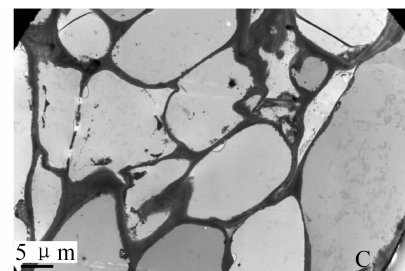
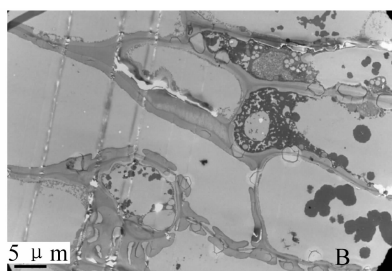
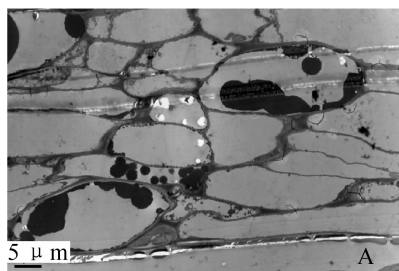


图9 随着 *Frankia* 菌侵入根系细胞壁出现沉积物并有加厚趋势(A: 早期细胞壁; B: 中期细胞壁; C: 晚期细胞壁, 4 000×)

Figure 9 Cell wall exhibited pigmentation and becoming thickening with the proceeding intracellularly of *Frankia* (A: early cell wall; B: interim cell wall; C: terminal cell wall, 4 000×)

### 3 讨论

*Frankia* 菌与木本植物共生结瘤后产生裂瓣状根瘤, 有时数个根瘤同时发生, 从而最终形成成熟的瘤簇。在本研究中木麻黄形成的根瘤均为圆形, 根瘤较小, 有时呈串珠状, 结果证实了土质不同形成的根瘤的形态和数量不同的报道。例如, 刘强等<sup>[16]</sup>发现土壤的比重、容量、孔隙影响木麻黄的结瘤数量、分布和形态。土壤颗粒越细、质地越硬, 孔隙就越小, 通气性就越差, 根系难以延伸, 不利于根瘤形成且根瘤较小。在本实验中因混配了大量的沙土, 最终多数根瘤产生在土壤 5~10 cm 的土层中, 且呈串珠状, 个体小, 数量多, 2 个菌株表现出一致性。研究还发现, 根瘤产生的时间不具有同一性, 第 1 个真正根瘤产生于接种后第 24 天, 在第 36 天的追踪取样时发现, 同一根系出现发育程度不同的根瘤, 且新出现根瘤多数出现在幼嫩新发出侧根上。可推断, 利用土壤根圈接种, 与 *Frankia* 菌最先接触的根系最易早期发生应答反应继而结瘤, 而后, 新产生的根系在延伸的过程中与存在于土壤中的菌丝再行接触形成次期根瘤。此外, 本实验中在盆钵的固定空间根瘤到达一定数量后不再增加, 或增加缓慢。原因可能是根瘤数目在一定空间达到饱和, 或者所产生根瘤已帮助宿主获得足够氮源从而抑制了新的根瘤产生。

*Frankia* 菌感染木麻黄是从根毛开始的, 通过化学的信号传导造成根毛变形然后进入表皮和皮层细胞<sup>[17-19]</sup>。但在本研究中, 因木麻黄产生的根毛稀少且在根表生长不连续, 未观察到有明显的根毛变形现象, 究其原因也可能是本研究以 3 d 为固定时间间隔取样错过根毛变形的最佳时期。Valverde 和 Wall<sup>[20]</sup>也通过定期制作超薄切片对 *Frankia-Disarcia trinervis* 的结瘤进行了监测, 但其结瘤的进程提前于我们的研究结果。这或许暗示 *Frankia* 菌与不同的寄主结瘤的时间程序不同, 除了寄主的因素外, 菌株的结瘤特性, 土壤的质地、肥力条件可能都将是影响结瘤进程的因素, 有待进一步研究。我们的研究发现, 在 *Frankia* 菌还在木麻黄根部皮层细胞感染繁殖时, 内部中柱鞘就受到刺激开始定向地快速分裂, 最终形成根瘤原基, 与前人的研究具有一致性。据此可推测, 在 *Frankia* 菌与宿主的共生关系中存在着某种信号转导, 但至今对于信号转导的机制没有相关报道, 这将是 *Frankia* 菌结瘤的另一研究热点。

## 参考文献:

- [1] BAKER D D, MULLIN B C. Actinorhizal symbioses [G]//STACEY G, BURNS R H, EVANS H J. *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Academic Press, 1992: 259 – 292.
- [2] LECHEVALIER M P. Taxonomy of the genus *Frankia* (Actinomycetales) [J]. *Inter J System Bacter*, 1994, **44**: 1 – 8.
- [3] LALONDE M, CALVERTH E, PINE S. Isolation and use of *Frankia* strains in actinorhizae formation [G]//GIBSON A H, NEWTON W E. *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Canberra: Australian Academy of Science, 1981: 296 – 299.
- [4] LECHVALIER M P, BAKER D, HORRIERE F. Physiology, chemistry, serology and infectivity of two *Frankia* isolates from *Alnus incana* subsp. *rugosa* [J]. *Can J Bot*, 1983, **61**: 2826 – 2833.
- [5] 吴建峰, 林先贵. 土壤微生物在促进植物生长方面的作用 [J]. *土壤*, 2003, **35**(1): 18 – 21.  
WU Jianfeng, LIN Xiangui. Growth promoting function of soil microorganisms on plants [J]. *Soil*, 2003, **35**(1): 18 – 21.
- [6] HILGER A B, MYROLD D D. Method for extraction of *Frankia* DNA from soil [J]. *Agri Ecosyst & Environ*, 1991, **34**(1/4): 107 – 113.
- [7] OAKLEY B, NORTH M, FRANKLIN J F, et al. Diversity and distribution of *Frankia* strains symbiotic with *Ceanothus* in California [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(11): 6444 – 6452.
- [8] CLAWSONA M L, BOURRET A, BENSONA D R. Assessing the phylogeny of *Frankia*-actinorhizal plant nitrogen-fixing root nodule symbioses with *Frankia* 16S rRNA and glutamine synthetase gene sequences [J]. *Mole Phylogen Evol*, 2004, **31**: 131 – 138.
- [9] OUREYE M, SAGNA M, DIEDHIOU S, et al. Devising an in vitro nodulation system for two actinorhizal plants: *Allocasuarina verticillata* (LAM.) L. Joneson and *Casuarina glauca* Sibe. ex Spreng (Casuarinaceae) [J]. *In Vitro Cell Bio Plant*, 2003, **39**: 545 – 550.
- [10] MCEWAN N R. Autofluorescence as a diagnostic tool for the infection of alder by *Frankia* [J]. *Sci Soil*, 2000, **5**: 3 – 8.
- [11] LIU Qin, BERRY A M. The infection process and nodule initiation in the *Frankia*-*Ceanothus* root nodule symbiosis [J]. *Protoplasma*, 1991, **163**: 82 – 92.
- [12] 张小民, 王岚, 林美珍, 等. 论沙棘根系与功能——*Frankia* 菌侵染和结瘤 [J]. *沙棘*, 2006, **19**(1): 1 – 10.  
ZHANG Xiaomin, WANG Lan, LIN Meizhen, et al. Discussion on roots and function of *Hippophae rhamnoides* L.: Infection and nodulation of *Frankia* [J]. *Hippophae Rhamnoides*, 2006, **19**(1): 1 – 10.
- [13] ZHANG Xin, SHEN Aihua, WANG Qiuqin, et al. Identification and nitrogen fixation effects of symbiotic *Frankia* isolated from *Casuarina* spp. in Zhejiang, China [J]. *Afric J Biotech*, 2012, **11**(17): 4022 – 4029.
- [14] 张昕, 马新颖, 王秋芹, 等. 浙江省木麻黄共生固氮菌 *Frankia* 的分离鉴定及固氮效应 [J]. *生态学杂志*, 2011, **30**(9): 126 – 131.  
ZHANG Xin, MA Xinyin, WANG Qiuqin, et al. Identification and nitrogen fixation effects of symbiotic *Frankia* isolated from *Casuarina* spp. in Zhejiang [J]. *J Ecol*, 2011, **30**(9): 126 – 131.
- [15] BENSON D R, SILVESTER W B. Biology of *Frankia* strains actinomycete symbionts of actinorhizal plants [J]. *Micro Rev*, 1993, **57**: 293 – 319.
- [16] 刘强, 张亚辉. 海口地区木麻黄林根瘤调查及影响结瘤的因子探讨 [J]. *林业科学*, 2002, **38**(5): 175 – 180.  
LIU Qiang, ZHANG Yahui. Investigation of root nodules and discussion of the factors which affect nodulation in *Casuarina equisetifolia* plantations in Haikou [J]. *Sci Silv Sin*, 2002, **38**(5): 175 – 180.
- [17] CALLAHAM D, TREDIC P D, TORREY J D. Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in *comptonia* [J]. *Science*, 1978, **199**: 899 – 902.
- [18] BERRY A M. The actinorhizal infection process: review of recent research [G]//KLUSG M, REDDY C. *Current perspectives in Microbial Ecology*. Washington D C: American Society of Microbiology, 1984: 222 – 229.
- [19] OBERTELLO M, OUREYE M, LAURENT L, et al. Actinorhizal nitrogen fixing nodules: infection process, molecular biology and genomics [J]. *Afric J Biotech*, 2003, **2**(12): 528 – 538.
- [20] VALVERDE C, WALL L G. Time course of nodule development in the *Discaria trinervis* (Rhamnaceae)-*Frankia* symbiosis [J]. *New Phytol*, 1999, **141**: 345 – 354.