

弗兰克氏菌共生固氮与分离培养技术研究进展

魏继华, 李佳益, 何彩云*

(中国林业科学研究院林业研究所/国家林业和草原局林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘要: 弗兰克氏菌是一种能与非豆科植物共生形成根瘤并实现生物固氮的放线菌, 因其生长周期、营养方式以及生理生化特性等原因, 导致分离培养中难以获得纯培养菌株, 使其研究进展缓慢, 而探索新型培养基与新的分离方法有望成为新的出路。本文对弗兰克氏菌的共生固氮与分离培养的研究现状进行较详细的综述, 以期为进一步探究提供参考。

关键词: 弗兰克氏菌; 共生固氮; 分离培养; 形态结构; 研究进展

中图分类号: Q939.113; S144.5 文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)02-0056-06

Research Progress on Symbiotic Nitrogen Fixation and Isolation Culture of Frankia

WEI Jihua, LI Jiayi, HE Caiyun*

(Research Institute of Forestry Chinese Academy of Forestry/Key Laboratory of Forest Cultivation, National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: Frankia is an actinomycete that can symbiotically form nodules with non-legumes and achieve biological nitrogen fixation. Due to its growth cycle, nutritional mode and physiological and biochemical characteristics, it is difficult to obtain pure culture strains in isolation and culture, which makes its research progress slow. Therefore, it is expected to explore new medium and new separation method. The study found that exploring new media and new separation methods is expected to be a new outlet. In this paper, the research status of symbiotic nitrogen fixation and isolation culture of Frankia is reviewed in detail, in order to provide reference for further research.

Key words: Frankia; Symbiotic nitrogen fixation; Isolation and culture; Morphological structure; Research progress

1 弗兰克氏菌的研究历史与分类

1.1 弗兰克氏菌研究历史

国外对弗兰克氏菌的研究较早, 在 1829 年就有关于桤木结瘤的报道^[1]。1902 年 Shibata 认为杨梅根瘤内生菌—弗兰克氏菌是放线菌, 之后, 学界对此众说纷纭。直至 1964 年 Becking 用透射电镜观察欧洲桤木的根瘤内生菌, 发现其为原核分枝菌并将其归于放线菌^[2], 并于 1970 年正式命名该微生物为弗兰克氏菌, 在放线菌目中设弗兰克氏菌科 (Frankiaceae) 和弗兰克氏菌属 (Frankia)^[3], 同时根据其细胞壁成分及与宿主共生的专一情况分为 10 个种, *F. alin* 为典型种 (Becking)。在 Bond

等的倡议下, 国际生物学规划 IBP 自 1967 ~ 1976 年对全世界的木本双子叶植物结瘤资源开展调查, 最终统计有 8 科, 24 属, 200 多种木本双子叶植物与之共生结瘤^[4]。弗兰克氏菌通过独特的泡囊结构与放线菌结瘤植物进行共生固氮, 弗兰克氏菌与宿主植物所形成的共生固氮体系在自然状态下固定大气中氮素, 改善土壤肥力, 增强宿主植物抗逆性, 促进植物在贫瘠地区的生长, 在三北地区的土壤改良、防风固沙、保持水土、改善生态环境等一系列工程中起着巨大作用^[3-4]。

国内对弗兰克氏菌与放线菌结瘤植物研究起步较晚。1977 年, 中国科学院植物生理研究所曾探究放线菌结瘤植物木麻黄、胡颓子的固氮能力; 1978 年, 中国科学院林业土壤研究所在全国范围内开展弗兰克氏菌宿主植物的资源调查, 表明我国放线菌结瘤植物种类丰富, 有 5 科 6 属 44 种^[5]。巧合的是, 时至今日统计的宿主植物全部为非豆科木本植物的乔木或灌木, 尚未发现单子叶草本植物具备与放线菌结瘤共生固氮的功能。

收稿日期: 2019-03-27

基金项目: 中国林业科学研究院林业研究所林木培育重点实验室专项 (ZDRIF201706)

作者简介: 魏继华 (1997-), 男, 在读硕士, 从事树木生理生化研究。

通讯作者: 何彩云, 女, 博士, 研究员, E-mail: hecy@caf.ac.cn

自1964年对弗兰克氏菌进行命名后的十四年间,对弗兰克氏菌的研究进展一直十分缓慢,大部分研究重心在资源调查与形态描述等宏观层面。1978年Callaham等^[6]运用酶解法从香蕨木(*Compositina pergrina*)根瘤中分离到弗兰克氏菌菌株,并成功地完成回接实验^[7]后,弗兰克氏菌的研究才获得突破性进展,而各国科研工作者相继从很多弗兰克氏菌宿主植物中获得弗兰克氏菌纯培养菌株,但目前回接方面还有亟待处理的难题,一部分菌株分离成功后再回接到原宿主,并未得到侵染成功的植株;还有一部分菌株可以通过回接来感染不同于宿主植物所在科属的植物。1978~2019年各国科学家对弗兰克氏菌形态特征、细胞化学组成、生理类型、生物学特性、分子鉴定、系统发育、遗传与多样性等各个方面进行广泛研究并取得巨大进展,但目前因其生长周期、营养方式以及生理生化特性等原因使得研究进展相对缓慢,而且因为一些技术难题,使研究在整体上处于瓶颈期。

1.2 弗兰克氏菌的分类

弗兰克氏菌的鉴定比较复杂,目前研究进展尚未满足确定的分类标准,所以当前世界公认弗兰克氏菌只分类到属,没有确切的种名。1970年,Becking根据弗兰克氏菌与宿主植物的关系将其划分为10个种,但因弗兰克氏菌对宿主的非专一性导致的交叉侵染能力不同使得该分类方法没有被认可^[8]。研究发现,即使从同一株放线菌结瘤宿主植物上分离出的两种不同菌株,其形态特征、生理生化特性等存在明显差异。20世纪90年代随着对弗兰克氏菌的广泛研究,李志真等就同工酶类型、脂肪酸含量、不同菌株形态、血清型、生理生化、细胞结构等差异分别进行探讨,以通过结果差异、现象不同和反应类型等进行分类^[8]。以期可以将弗兰克氏菌从属定到种,但因菌株材料有限,难以证明其可靠性。

随着中性理论的提出、核酸演化速率的精准计算、分子钟的广泛应用和分子生物学的飞速发展,近二十年对定种问题的研究逐渐趋向于微观领域。合理运用DNA-DNA杂交、免培养技术、16SrRNA高变区探针、高通量测序、特异性蛋白图谱及 rm 和 nif 基因序列分析、DNA限制性片段长度多样性(RELP)随机扩增DNA片段多态性(RAPD)等方法,对弗兰克氏菌的研究提高到一个新的水平,对分类到种的研究具有推动性。

依据Lechevalier判断标准,有如下定义标准

为弗兰克氏菌的形态特征观察与初步鉴定提供借鉴:(1)分离出的菌株可以在宿主植物上诱发形成有效或无效根瘤,并能从根瘤中重新分离到纯培养;(2)可以在液体培养基中产生不动孢子的孢囊,有时可以形成孢囊^[8];(3)自由生活还不清楚有侵染能力或固氮能力的放线菌,只要具有上述(2)的形态特征,也可作为弗兰克氏菌进行研究。

2 弗兰克氏菌的形态特征与培养特征

2.1 弗兰克氏菌的形态特征

弗兰克氏菌的纯培养过程中,其经典形态结构为菌丝、孢囊、泡囊,特殊结构为串珠状菌丝^[9]。

(1)菌丝:植物体外培养环境下呈分枝状,粗细不均,波曲程度各有差异,菌丝有横隔,直径 $0.2 \sim 1.5 \mu\text{m}$ ^[10],电镜下观察可见细胞壁分为内外两层^[11]。在模式菌株CpII的菌丝外,还包有多层外膜^[12]。(2)孢囊:随着菌丝的生长,在末端或菌丝的中间膨大或纵横分裂形成含有孢子的多室孢子囊^[13]。在不同培养基上,孢囊数量各不相同,没有统一规律。孢子形状多样,孢囊大小不一。根据菌的年龄及营养情况不同,孢子囊的数量以及孢子数量不同。孢子壁厚,无鞭毛,不能游动,有2~3层膜状结构。弗兰克氏菌有可能在根瘤中形成孢囊,根据根瘤中是否有孢子生殖,将弗兰克氏菌定义为 Sp^+ 或者 Sp^{-14} 。(3)泡囊:泡囊呈球形,着生在菌丝顶端或短小的孢囊柄上,圆形,直径为 $0.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$,为弗兰克氏菌的固氮场所,在缺少N元素的情况下形成,是固氮酶的固氮场所^[15-16]。泡囊的典型特征是外面有膜,这层膜由多层类固醇和霍烷类构成^[17],可能用于帮助平衡固氮酶周围的氧压力,而且包膜是连续的,比菌丝的隔膜还细。在被感染的植物细胞中,泡囊的形状大小、在泡囊中隔膜的出现和消失以及囊泡的空间分布是不同的,这主要是由宿主所决定的^[18]。泡囊就是固氮酶的所在位置^[19],但是在木麻黄和异木麻黄属的固氮酶是存在于菌丝上的。据研究,培养基成分的差异对泡囊的影响比较小^[8]。(4)串珠状菌丝:这个结构与弗兰克氏菌逆境生存与繁衍有密切关系。孢子细胞组成的宽营养菌丝被分割成多层后形成串珠状结构。李志真等在木麻黄中发现长短不一的由菌丝形成的串珠状孢子,还可以在末端看到椭圆形结构^[8],在胡颓子根瘤^[20-21]中也发现这种结构。在某些马桑根瘤内生菌纯培养中还发现在串珠状菌丝的顶端或中间有一个与鱼腥

藻中的异形胞相似,比串珠细胞大得多、呈椭圆形或短柱形的结构,但是对于其功能的研究目前尚未有太多进展^[22]。

2.2 弗兰克氏菌培养特征

弗兰克氏菌是一类生长缓慢、用液体培养基培养和保存的微好氧放线菌。一般来讲,弗兰克氏菌的菌丝体常有的液体培养特征是在培养器的底端附着程度差别较大,菌落形态多呈絮状、颗粒状、圆球状、少数呈片状。一些菌株可以在固体培养基上生长,一般2~3周才能看见菌落,一些菌落可生长半年以上^[23],菌落致密,有光泽,无气生菌丝。在固体培养基中,菌落外形不一、直径普遍较大、与培养基结合紧密、颜色多为白色,不易挑取。气生菌丝形态各异、质地坚实^[24],在不同培养基上生长的直径不同,从1~2 mm至4~5 mm不等。无色、橙黄色、嫩红色、深灰色、深棕色、蓝绿色等都是菌丝体在液体培养基或固体培养基上的表达颜色,有一些菌株还可产生可溶性色素:黄、绿、棕、红、黑等^[25]。研究发现,菌株种类、培养基成分、培养时间、培养方式等研究变量与表达颜色、分泌色素的不同有着密切联系。

3 弗兰克氏菌的分离与保存技术

3.1 弗兰克氏菌株的分离技术

导致弗兰克氏菌研究进展缓慢的主要因素是难以获得纯培养菌株,分析原因如下:(1)弗兰克氏菌在人工培养环境下生长缓慢,需半个月到一个月方可长成。(2)人工培养基难以满足根瘤内生菌营养方式与要求的转变。(3)环境中其他微生物的侵染、污染等。(4)根瘤内部产生酚类化合物干扰内生菌生存^[26-28]。对此,在最初分离时 Callabam 等采用酶解法首次从香蕨木的根瘤中分离出放线菌常规培养后又成功回接到寄主幼苗根系,得到回接成功的原宿主植株,而且运用乙炔还原法通过气相色谱仪检测到乙炔的产生量很高,绝大部分乙炔被还原。而从再感染的菌株中分离出同一放线菌并对其进行免疫学检验与超微观察,证明 Callabam 等所分离菌株具有感染性。此后在 Callabam 等基础上发展起来的培养方法逐渐多样化,包括糖梯度离心法(Baker)、系列稀释法(Diem)、分级过滤法(Benson)、根瘤切片法(Lalonde)、根瘤匀浆法(黄家彬)和土壤直接分离法(Baker)等共6种方法。其中根瘤切片法与根瘤匀浆法因其简便性与高效快捷而成为现今进行弗兰克氏菌分离最为常用方法^[29-36]。当运用根瘤切片

与根瘤匀浆法时,因瘤瓣形态结构复杂,在表面消毒无法彻底进行而易导致杂菌感染,秦敏等针对性提出运用改进的根瘤切片法^[37],即在经典根瘤切片法的基础上,将表面消毒并清洗过的小瘤瓣转瓶至LB培养基进行8 d培养,再选取未染杂菌的瘤瓣进行切片培养,该方法具有分离速度快、污染率降低、方便检查表面灭菌是否彻底、工作量减少、仪器药品简单、操作简便、成功率高、效果显著等优点。

随着对酶解法研究的深入,人们发现影响分离培养成败的关键因素是合理选用表面消毒剂 and 消毒时间,而对根瘤切片进行的酶处理只是有利于内生菌从宿主细胞中释放出来。根据目前全球各研究所分离情况可知,当前的弗兰克氏菌仍然是生长极其缓慢的,需要一年多才有较好的观察特征,这样的生长速度无法满足基础研究需求,更无法满足未来田间试验与广泛应用,因此加快分离菌株的生长速度成为亟待解决的问题。为解决此问题,在分离和生长培养基中一般要额外添加特殊促生长因子,譬如从赤杨皮根周围的油脂提取出来的三萜烯、龙脑香醇酮或类黄酮^[38],也可在液体培养基中添加赤杨皮种子提取物加快弗兰克氏菌的生长速度^[39]。陈冠雄等提出一种新型培养基即PCY培养基,该培养基主要组成成分为马铃薯、胡萝卜与酵母膏^[40],具有成分简单、容易获取、药品低廉、培养效果好等优势,对未来弗兰克氏菌剂的广泛应用有一定的借鉴意义。

Bassi 等将吉兰糖胶作为一种胶凝剂和特定的蛋白胨而制成的一种新型固体培养基,在培养3 d后可用肉眼观察到弗兰克氏菌 HFPCe13 的衍生物。综上可知选择正确的培养基对弗兰克氏菌的分离可起到事半功倍的效应^[41],但因放线菌结瘤植物的不同、地理生态环境的不同等因素影响,哪种培养基更适合分离弗兰克氏菌株并进行纯培养,目前业内并无统一说法。就培养基状态而言,一般认为弗兰克氏菌在液体培养基上的生长效果优于固体培养基。研究表明,25~33℃是弗兰克氏菌适宜生长温度,而30℃左右是最适温度,当低于20℃或高于37℃时弗兰克氏菌的生长则会受到抑制。pH为6.5~7.5的培养基对弗兰克氏菌而言是适宜的,而pH为中性时对弗兰克氏菌的生长最理想,偏酸或偏碱的培养条件时弗兰克氏菌的生长会受到抑制。

3.2 弗兰克氏菌的保存技术

到目前为止,已从木麻黄、杨梅、沙棘等诸多

放线菌结瘤植物中得到弗兰克氏菌的纯培养菌株,但是弗兰克氏菌生长速度缓慢,对分离条件要求较高,且容易感染杂菌,因此如何妥善保存现有菌株显得尤为重要。苏岩凤等^[29]通过比较无氮液体保藏法、有氮液体保藏法、冷冻干燥保藏法和砂管保藏法等4种方法,发现无氮液体保藏法的菌株菌体细胞生长速度快、固氮活性强、有侵染结瘤能力,且简单易行,保存时间久,实际应用性强。康丽华等^[42]研究木麻黄弗兰克氏菌3种菌剂类型(海藻酸钠胶囊菌剂、草炭菌剂和蛭石菌剂)、2种保藏温度(4℃冰箱和室温条件下)及不同保藏时间(保藏3、6、9、12、24个月)对苗木接种效果的影响,发现不同的保藏方法影响菌剂的接种效果。不同的菌株适应不同的保藏方法,目前尚无统一规律,需要实际验证方可明确,也有分析认为其保藏方法与弗兰克氏菌孢子形态有相关性。在保藏时间方面,发现随着保藏时间的延长,侵染效力呈现明显的下降状态,但是不同菌株对应的不同保藏菌剂的下降趋势与开始下降时间存在不成规律的较大差异,这也为日后弗兰克氏菌剂的开发、保存与长途运输等提供了借鉴^[43]。总体而言,不同的菌株因其生物学特性或遗传因素影响,在选择保存菌剂、保存方法与保存时间时应灵活应对。

4 总结与展望

根据固氮菌与宿主和环境的关系可将生物固氮分为自生固氮作用、联合固氮作用与共生固氮作用,而以根瘤菌主导的豆科植物共生固氮体系、以弗兰克氏菌与丛枝菌根为主的非豆科共生固氮体系与固氮蓝细菌主导的蓝藻共生体系共同组成共生固氮作用^[44-45]。通过对弗兰克氏菌分离、纯培养、形态结构特征与培养特征进行初步鉴定,展开针对非豆科植物共生体系的研究。

从根毛细胞侵染与根部薄壁细胞间隙侵入是弗兰克氏菌侵染宿主植物进行结瘤最常见的两种方式。例如,在弗兰克氏菌共生体系中木麻黄科植物与弗兰克氏菌结瘤是通过侵入根毛细胞内的感染方式结瘤,在胡颓子科中,早期的结瘤起始很可能通过从根毛表皮细胞间侵入形成根瘤。

(1)根毛侵染。弗兰克氏菌附着在根毛表面,引起根毛形态发生变化导致菌丝容易穿过细胞壁进入细胞形成内生菌。植物在感受到放线菌入侵后会发发生应答反应,产生分泌物形成荚膜结构覆盖菌丝表面进而扩展到整个皮层细胞,皮层薄壁

细胞经过分裂生长最后形成根瘤。随着菌丝体的不断生长,会激活中柱鞘细胞形成内源初生根瘤原基,再发育成根瘤分生组织,最后形成完整的根瘤。(2)细胞间侵入。这种侵染方式常见于胡颓子科,因胡颓子科根毛较少,弗兰克氏菌穿入细胞间,在侵染过程中不使根毛变形。弗兰克氏菌附着在根毛表面后侵染角质层,菌丝在表皮细胞间侵入细胞间隙,在中柱鞘形成初生根瘤原基,当穿破根部细胞表皮后进而产生荚膜转为内生菌,最终形成根瘤组织。

弗兰克氏菌与非豆科植物共生结瘤固氮具有以下特征:(1)专一性不强。弗兰克氏菌与宿主的共生关系没有根瘤菌与豆科植物间那么严格,宿主间的亲缘关系远近不同,与根瘤菌与豆科植物共生固氮对比明显^[46];(2)容易交叉感染。弗兰克氏菌不仅可以侵染原宿主,而且可以侵染宿主以外的不同科、属、种的植物,其侵染范围相对根瘤菌较为广泛^[47];(3)固氮机理独特。弗兰克氏菌具有一种特殊的固氮结构—泡囊,泡囊内含有高固氮活性的固氮酶,泡囊呈近圆形或椭圆形,位于菌丝顶端,同时泡囊也有多重片层状结构,这是一种防氧保护屏障^[48];(4)弗兰克氏菌内存在质粒,这为基因工程奠定了良好的物质基础^[49]。

我国对弗兰克氏菌的研究取得一定进展,但弗兰克氏菌独特的结构特性与生理特性导致的分离培养困难问题亟待解决,探索新型培养基与新的分离方法有望成为新的出路。同时对于菌株保存的研究应当与材料学等领域相结合,探索出一种应用性强的菌株保存方法,这对日后菌剂的开发与大规模应用具有积极意义。随着分子生物学的发展,从系统发育的角度或许可以解释弗兰克氏菌的一些生理特性,由此逆向应用并解决其生长缓慢的问题。

参考文献:

- [1] 曾定. 固氮生物学[M]. 厦门:厦门大学出版社,1987:182-212.
- [2] Becking J, Boer W E, H ouwink A. Electron microscopy of the endophyte of *Alnus glutinosa*[J]. *Antonie Van Leeuw enhoek*, 1964,30 (1):343-376.
- [3] Becking J H. Frankiaceae fam. nov. (Actinomycetales) with one new combination and six new species of the genus *Frankia* Brunchorst 1886, 174[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1970, 20(2):201-220.
- [4] Huang J B, Shen SH M, Liu H cH, et al. An investigation of the resource of Non-Leguminous nodulating trees in China[J]. *Advances in Nitrogen Fixation Research*, 1984,4(8):371-373.

- [5] Bond G. The results of the IBP survey of rot nodule formation in non leguminous angiosperms[J]. International Biological Programme, 1976, 7(15): 443-474.
- [6] Callaham D, Delteredici P, Torrey J. Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodule formation in Comptonia [J]. Science, 1978, 199(43): 899-902.
- [7] Lalonde M. Confirmation of the infectivity of a free-living actinomycete isolated from Comptonia peregrina root nodules by immunological and ultrastructural studies[J]. Canadian Journal of Botany, 1978, 56(21): 2621-2635.
- [8] 李志真. 福建弗兰克氏菌 Frankia 研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2002.
- [9] 吴如慧, 李增平, 陈礼浪. 木麻黄茎腐病原菌的鉴定及其生物学特性测定[J]. 热带作物学报, 2019, 40(2): 334-340.
- [10] Battenberg K, Potter D, Tabuloc C A, et al. Comparative Transcriptomic Analysis of Two Actinorhizal Plants and the Legume Medicago truncatula Supports the Homology of Root Nodule Symbioses and Is Congruent With a Two-Step Process of Evolution in the Nitrogen-Fixing Clade of Angiosperms[J]. Front Plant, 2018, 9(10): 1256.
- [11] Abeysekera R M, Newcomb W, Silvester W B, et al. A freeze-fracture electron microscopic study of Frankia in root nodules of *Alnus incana* grown at three oxygen tensions[J]. Canadian journal of microbiology, 1990, 36(2): 97-108.
- [12] Franche C, Bogusz D. Signalling and Communication in the Actinorhizal Symbiosis[J]. Springer Berlin Heidelberg, 2012, 11(13): 73-92.
- [13] Vásquez L, Pérez NO, Valdés M. Isolation and symbiotic characteristics of Mexican Frankia strains associated with Casuarina [J]. Applied Soil Ecology, 2000, 14(3): 249-255.
- [14] Merkus E. A Microscopical Study of the Development of a spore-like stage in the life cycle of the root-nodule endophyte of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn[J]. New Phytologist, 1976, 77(1): 73-91.
- [15] Toshihiro, Takizawa, Kouki, et al. Correlative Microscopy Using Fluoro Nanogold on Ultrathin Cryosections: Proof of Principle[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2016, 46(10): 1097-1102.
- [16] Yamanaka T, Okabe H, Kawai S. Growth and nodulation in *Alnus sieboldiana* in response to Frankia inoculation and nitrogen treatments[J]. Trees, 2016, 30(13): 539-544.
- [17] Berry A M, Harriott O T, Moreau R A, et al. Hopanoid lipids compose the Frankia vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993, 90(13): 6091-6094.
- [18] Huss-Danell K. Tansley Review No. 93 Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation[J]. The New Phytologist, 1997, 136(3): 375-405.
- [19] Huss-Danell K, Bergman B. Nitrogenase in Frankia from root nodules of *Alnus incana* (L.) Moench: immunolocalization of the Fe- and MoFe-proteins during vesicle differentiation[J]. New Phytologist, 1990, 116(3): 443-455.
- [20] 王金华, 聂中良, 徐玉巧, 等. 根瘤菌回接对蚕豆生长及抗根腐病能力的影响[J]. 西南林业大学学报, 2018, 38(4): 94-99.
- [21] 周雪娟, 马春草, 李亚楠, 等. 华癸根瘤菌 *urtB* 基因突变株的构建与共生固氮表型分析[J]. 微生物学报, 2019, 59(2): 374-385.
- [22] 胡传炯, 周平贞, 周 启, 等. 马桑根瘤内生菌纯培养物的分离、回接及其生物学特性研究[J]. 中国农业科学, 1999, 32(2): 74-79.
- [23] Ho K J, Mamoru K, Kazuo S Y, et al. Distribution and functional analysis of the phosphopantetheinyl transferase superfamily in Actinomycetales microorganisms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, 9(35): 65-77.
- [24] 徐瑞瑞, 沙棘弗兰克氏菌与非弗兰克氏菌的分离、培养及分子鉴定[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2011.
- [25] Benson D R, Silvester W B. Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1993, 57(2): 293-319.
- [26] 杨 茉, 高 婷, 李滢璟, 等. 辣椒根际促生菌的分离筛选及抗病促生特性研究[J]. 生物技术通报, 2020, 36(5): 109-114.
- [27] 靳海洋, 王 慧, 张燕辉, 等. 稻田土壤固氮菌株的分离筛选及促生潜力[J]. 生物技术通报, 2020, 36(6): 73-82.
- [28] 葛江丽, 施汉钰, 刘桂棋, 等. 水稻根际固氮菌分离及最适培养条件研究[J]. 东北农业科学, 2018, 43(4): 57-60.
- [29] 苏凤岩, 张忠泽. Frankia 菌种保藏[J]. 微生物学报, 1994, 34(2): 148-151.
- [30] 邓进超, 关一鸣, 吴连举, 等. 人参锈腐病菌拮抗菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 东北农业科学, 2017, 42(3): 31-38.
- [31] 韩雨桐, 刘 焯, 张淋淋, 等. 稻瘟病菌拮抗细菌的筛选及其防效作用研究[J]. 东北农业科学, 2016, 41(3): 67-72.
- [32] 王 琳, 姜 云, 马贵龙. 放线菌菌株 1a 发酵液抗菌谱及抗菌物质稳定性研究[J]. 东北农业科学, 2010, 35(2): 27-29.
- [33] 刘振库, 贾 娇, 苏前富, 等. 齐齐哈尔玉米穗腐病原菌的鉴定和致病性测定[J]. 吉林农业科学, 2014, 39(6): 30-32.
- [34] 林红梅, 施建飞, 李岳桦, 等. 西洋参病原菌拮抗细菌的分离筛选与鉴定[J]. 东北农业科学, 2013, 38(6): 62-75.
- [35] 郭继平, 马 光, 朱会霞, 等. 葡萄霜霉病拮抗真菌的分离筛选及鉴定[J]. 东北农业科学, 2014, 39(5): 72-75.
- [36] 许 超, 曲勤凤, 顾文佳, 等. 新型可降解高效氯氟酯微生物菌株的筛选、鉴定及条件优化[J]. 东北农业科学, 2016, 41(2): 70-73.
- [37] 秦 敏, 王焰玲, 马庆生. 木麻黄根瘤内生菌 Frankia 的分离和鉴定[J]. 西南农业学报, 1989, 2(2): 38-43.
- [38] Sayed W F, Wheeler C T. Effect of the flavonoid quercetin on culture and isolation of Frankia from Casuarina root nodules[J]. Folia microbiologica, 1999, 44(1): 59-62.
- [39] Selim S H, Schwencke J. Simple and reproducible nodulation test for Casuarina-compatible Frankia strains: Inhibition of nodulation and plant performance by some cations[J]. Arid Land Research and Management, 1995, 9(1): 25-37.
- [40] 陈冠雄, 禹阿东, 吴 杰, 等. 介绍一种新的适合 Frankia 生

- 长的培养基[J]. 微生物学杂志, 1986, 6(4):57-58.
- [41] Bassi C A, Benson D R. Growth characteristics of the slow growing Actinobacterium *Frankia* sp. strain Cc13 on solid media[J]. *Physiologia Plantarum*, 2007, 130(3):391-399.
- [42] 康丽华, 李素翠, 彭耀强, 等. 木麻黄弗兰克氏菌的菌剂类型与保藏方法对接种效果的影响[J]. 林业科学研究, 1999, 12(4): 374-378.
- [43] 朱华玲, 班立桐, 黄亮, 等. 不同介质对真姬菇菌种保藏效果的对比[J]. 中国食用菌, 2020, 39(2): 44-47.
- [44] 周超, 马宝新, 刘海燕, 等. 增密减氮对嫩单18产量和氮素利用率的影响[J]. 东北农业科学, 2019, 44(2): 7-12.
- [45] 栾天浩, 翟季, 孙祎龙, 等. 密度与氮、磷、钾用量对花生吉花1号产量的影响[J]. 东北农业科学, 2017, 42(4): 23-26.
- [46] 王娜媛. 弗兰克氏菌与红桉木共生体系的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2011.
- [47] 陈启峰, 李志真, 黄群策. 弗兰克氏菌的研究进展与前景[J]. 福建农业大学学报, 1998(4): 385-392.
- [48] 曲东明, 范浩南, 韩善华. 弗兰克氏菌在构建新的共生固氮物种研究中的优越性[J]. 中国微生态学杂志, 1997(4): 62-63.
- [49] Schwob G, Roy M, Pozzi A C, et al. In Planta Sporulation of *Frankia* spp. as a Determinant of Alder-Symbiont Interactions[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(23): 17-37.

(责任编辑: 王昱)



(上接第55页)

- [1] 高微微, 焦晓林, 毕武. 罹病西洋参根内主要人参皂苷含量的变化[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(24): 2905.
- [2] 王立新, 孙先荣, 白全江, 等. 黄芪根腐病病原菌鉴定[J]. 华北农学报, 1994(2): 107-109.
- [3] 陈垣, 朱蕾, 郭凤霞, 等. 甘肃渭源蒙古黄芪根腐病病原菌的分离与鉴定[J]. 植物病理学报, 2011, 41(4): 428-431.
- [4] 罗光宏, 陈叶, 王振, 等. 黄芪根腐病发生危害与防治[J]. 植物保护, 2005(4): 75-76.
- [5] 牛世全, 耿晖, 韩彩虹, 等. 甘肃陇西黄芪根腐病病原菌的分离与鉴定[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2016, 52(2): 75-78, 83.
- [6] 高芬, 赵晓霞, 秦雪梅, 等. 山西省蒙古黄芪根腐病优势致病菌群分析[J]. 植物保护学报, 2018, 45(4): 878-885.
- [7] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 46-47.
- [8] 刘焯, 赵兴红, 韩雨桐, 等. 黑龙江省水稻立枯病病原鉴定及致病性研究[J]. 吉林农业科学, 2015, 40(5): 75-78, 84.
- [9] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 2003, 270: 313-321.
- [10] Seifert K A, Samson R A, Dewaard J R, et al. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104: 3901-3906.
- [11] Armstrong K F, Ball S L. DNA Barcodes for biosecurity: invasive species identification[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 2005, 360: 1813-1823.
- [12] Seifert K A. Progress towards DNA barcoding of fungi[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(S1): 83-89.
- [13] 王宏, 常有宏, 陈志谊. 梨黑斑病病原菌生物学特性研究[J]. 果树学报, 2006, 23(2): 247-251.
- [14] Ospina-Giraldo M D, Mullins E, Kang S. Loss of function of the *Fusarium oxysporum* SNF1 gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*[J]. *Curr Genet*, 2003, 44: 49-57.
- [15] Keukens E A J, Devrije T, Vanden Boom C, et al. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1240(2): 216-228.
- [16] Lairini K, Perez Espinosa A, Pineda M, et al. Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 1604-1609.
- [17] 王春玲, 耿肖兵, 黄铭慧, 等. 一种引起大豆根腐病的尖镰孢致病性苗期鉴定方法[J]. 吉林农业科学, 2015, 40(3): 69-72.
- [18] 齐祖同, 孔华忠. 中国真菌志[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 76-92.
- [19] 陈鸿逵, 王拱辰. 浙江镰刀菌志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1992: 28-40.
- [20] 张铨哲, 韩晓旭, 郭衍锦, 等. 东北地区水稻、小麦和玉米镰孢菌鉴定与ZEN毒素检测[J]. 东北农业科学, 2018, 43(1): 16-23.
- [21] 马晶晶, 曾静, 客绍英, 等. 板蓝根病害的发生及其防治技术[J]. 中国农学通报, 2006, 22(2): 339.
- [22] 姬广海, 吴亚鹏, 张乃明, 等. 芦荟根腐病病原菌的鉴定[J]. 植物病理学报, 2007, 37(2): 207.
- [23] 吴玉柱, 季延平, 赵桂华, 等. 牡丹根腐病及其防治的研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2005, 29(6): 69.
- [24] 闫文雪, 石延霞, 李盼亮, 等. 大白菜枯萎病病原镰刀菌种类的初步研究[J]. 植物病理学报, 2018, 48(5): 587-593.
- [25] 雷梦英, 杨晓朱, 李落叶, 等. 广东火龙果果柄腐烂病原菌的分离及鉴定[J]. 广东农业科学, 2018, 45(3): 94-98, 173.
- [26] 邱睿, 白静科, 李成军, 等. 河南烟草镰刀菌的分子鉴定及致病性分析[J]. 中国烟草学报, 2018, 24(2): 129-134.
- [27] 杨迎青, 兰波, 孙强, 等. 芦笋枯萎病菌的鉴定及rDNA ITS序列分析[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(2): 22.
- [28] Lazarotto M, Muniz M F B, Santos R F D, et al. First report of *Fusarium equiseti* associated on pecan (*Carya illinoensis*) seeds in Brazil[J]. *Plant Disease*, 2014, 98(6): 847.

(责任编辑: 刘洪霞)