

自辽东赤杨根瘤分离的弗兰克氏菌的分类研究

张显科

(辽宁大学生物系, 沈阳)

刘文霞 王常仕

(沈阳师范学院生物系, 沈阳)

阮继生

(中国科学院微生物研究所, 北京)

自辽东赤杨(*Alnus sibirica*)的根瘤中分离得到 AS₂ 菌株。该菌株形成圆形或棒状孢囊和圆形泡囊。细胞壁化学组分 III 型, 糖型为 D。不利用阿拉伯糖、葡萄糖、甘油、麦芽糖、蔗糖、山梨醇和木糖。在 S 培养基中, 菌的生长受 Tween-80 和葡萄糖协同作用的影响, 属于生理型 B。DNA 的 G + C 含量为 77.34 mol% (T_{1m})。因此, 该菌株定为 *Frankia* sp. AS₂。

关键词 辽东赤杨; 弗兰克氏菌

自 1978 年弗兰克氏菌离体培养成功^[1], 引起了许多国家对这一新的固氮资源的重视, 先后从不同非豆科植物的根瘤中分离出几十株菌。1983 年, 我们从辽东赤杨根瘤中分离到弗兰克氏菌, 对其进行了分类研究。本文报道该菌的鉴定结果。

材料和方法

(一) 菌株

AS₂ 菌株分离自沈阳市园林研究所的辽东赤杨 (*Alnus sibirica* Fisch.) 根瘤。

对照菌株: *Frankia* sp. Air1, 菌株分离自灰桤木粗糙亚种 (*Alnus incana* subsp. *rugosa*)*; *Frankia* sp. Cpl, 菌株分离自香蕨木 (*Comptonia peregrina*)*。

(二) 分离方法

将新鲜根瘤用自来水冲洗掉表面的泥沙。用 75% 酒精处理 10 分钟, 无菌水冲洗。再用 0.1% 氯化汞分别处理 10 或 15 分钟, 无菌蒸馏水冲洗数次除净氯化汞。将瘤用无菌解剖刀切成约 1mm 厚的瘤片。把不同杀菌时间的瘤片分别置于灭过菌的 QMod^[2]、S^[3]、S+TW^[3] 和 Blom-Akkermans^[4]

培养基试管内, 并涂抹。置 28℃ 温箱内培养。一周后定期观察和镜检。

(三) 鉴定方法

全细胞与纯细胞壁化学组分测定参照 Becker^[5]、Lechevalier^[6] 与 Hasegawa 等人^[7] 报道的方法。生理型测定按照 Lechevalier 的方法^[8]。碳源的利用与产酸试验采用 Lechevalier 的方法^[9]。DNA 中 G + C 含量的测定参照 Marmur^[10] 和林万明等人^[9]的方法。用 *E. coli* AS 1.365 的 DNA 为参照 DNA。

结 果

(一) 形态特征

AS₂ 菌株生长缓慢。菌丝稀疏, 长有分枝, 直径 0.8—1.3 μm。在菌丝的短侧枝或菌丝顶端着生大小不等的圆形、卵圆形或

本文于 1985 年 10 月 9 日收到。

中国科学院微生物研究所刘志恒、张亚美 和王平同志参加部分工作, 在此一并致谢。

* 美国瓦克斯曼微生物研究所 M. P. Lechevalier 教授惠赠。



图1 孢囊的光学显微镜照片(1,320×)

Fig. 1 Micrograph of sporangium

棒状的孢囊(图1、2),直径在几微米到几十微米。在不同培养基上其孢囊形状大小

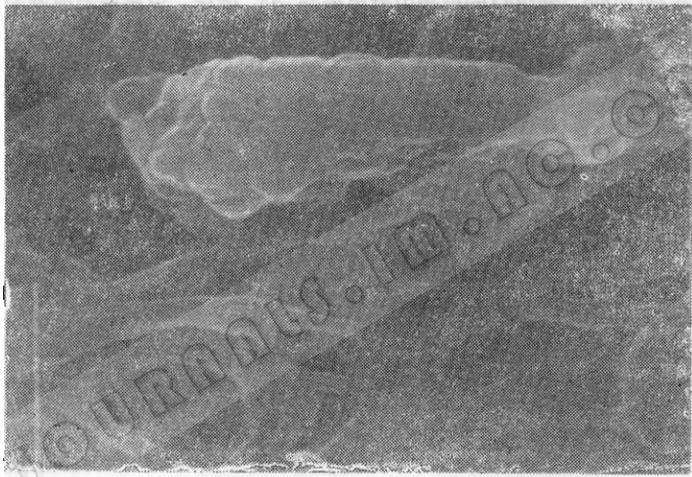


图2 孢囊的扫描电子显微镜照片(5,000×)

Fig. 2 SEM micrograph of sporangium



图3 孢囊的光学显微镜照片(1,320×)

Fig. 3 Micrograph of vesicle

加 Tween-80 的菌体干重大大高于不加

差别很大。孢囊内纵横隔分裂形成圆形或不规则立方形的孢子,直径1—1.2 μm ,无鞭毛,不运动。在离体培养初期可见圆形孢囊,具短柄,直径4 μm 左右(图3)。

(二) 全细胞与纯细胞壁化学组分

AS₂ 菌株胞壁组分属于 III 型(含 meso-DAP)。胞壁糖型为 D(含木糖、半乳糖)。

(三) 生理型

Tween-80 和葡萄糖对菌生长的影响见图4。在 S 培养基中, Tween-80 和葡萄糖有协同作用,在含有葡萄糖的情况下,

Tween-80 的。按 Lechevalier 生理型的结果, AS₂ 菌株应属于生理型 B。

(四) 碳源的利用和产酸

不同碳源利用的结果表明, AS₂ 菌株和 B 型模式菌株 CpI₁ 均不利用阿拉伯糖、葡萄糖、甘油、麦芽糖、蔗糖、山梨醇和木糖,而 AirI₂ (A 型) 菌株利用葡萄糖、麦芽糖和蔗糖,虽不利用木糖,但产酸。按 Lechevalier 的观点, B 型的菌株在无 Tween-80 协同的情况下不利用各种糖,因此, AS₂ 菌株确系生理型 B。

(五) DNA 中 G + C 含量

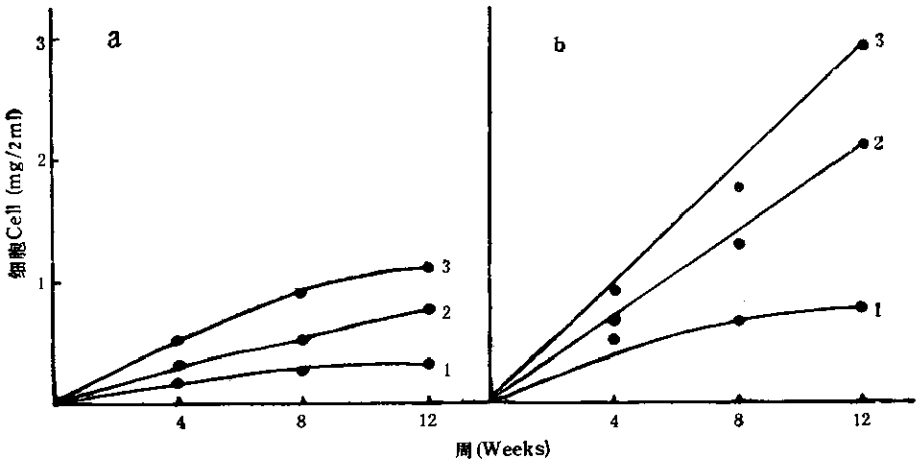


图4 在S培养基中 Tween-80 和葡萄糖对 *Frankia* sp. AS₂ 生长的影响

Fig. 4 Influence of Tween-80 and glucose on growth of *Frankia* sp. AS₂ in S medium

a. 无 Tween-80 (—Tween-80) b. 0.2% Tween-80

1. 无葡萄糖 (—Glucose) 2. 1%葡萄糖 (1% Glucose) 3. 2%葡萄糖 (2% Glucose)

菌株 AS₂ 的 DNA 中 G + C 含量为 77.34mol%。

讨 论

从分类学观点看, 虽然 AS₂ 菌株尚未回接上, 但根据细胞壁组分和形态特征, 可确定是弗兰克氏菌。

自离体培养成功后发现, 有些菌是多宿主的^[10], 有的菌对原宿主无侵染力^[3], 也有的菌是从相距 30km 同一种宿主植物分离出形态和生理等特性完全不同的两株菌^[3]。因而交叉接种很难看出种的差别。所以曾用宿主植物名定菌的种名是不适当的。目前, 弗兰克氏菌属内种的分类指征尚在探索中, 为避免种名混乱, 根据 Lechevalier^[11] 的建议, 将辽东赤杨根瘤中分离的菌株定为 *Frankia* sp. AS₂。

参 考 文 献

[1] Callahan, D. et al.: *Science*, 199: 899—902,

1978.

- [2] Lalonde, M. and H. E. Calvert: In *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests* (ed. by Gordon, J. C. et al.), Oregon State University Press, OR., pp. 95—110 1979.
- [3] Lechevalier, M. P. et al.: *Can. J. Bot.*, 61: 2826—2833, 1983.
- [4] Blom, J. et al.: *FEMS Microbiol. Letters*, 9: 131—135, 1980.
- [5] Becker, B. et al.: *Appl. Microbiol.*, 13: 236—243, 1965.
- [6] Lechevalier, M. P. et al.: *Actinomycete Taxonomy* (ed. by Dietz, A. and D. W. Thayer), SIM Special Publication No. 6, U.S.A., pp. 228—237, 1980.
- [7] Hasegawa, et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29: 319—322, 1983.
- [8] Marmor, J. and P. Doty: *J. Mol. Biol.*, 5: 109—118, 1962.
- [9] 林万明等: *微生物学通报*, 8(5): 245—247, 1981。
- [10] Zhao Zhenyiny et al.: *Current Research on Frankia and Actinorhizol Plants Inter. Symposium Montmorency Forest, Aug. 1984.*
- [11] Lechevalier, M. P.: *Plant and Soil*, 78: 1—6, 1984.

TAXONOMIC STUDIES OF *FRANKIA* SP. AS₂ ISOLATED FROM THE NODULES OF *ALNUS SIBIRICA*

Zhang Xianke

(Department of Biology, Liaoning University, Shenyang)

Liu Wenxia Wang Changshi

(Department of Biology, Shenyang Teacher's College, Shenyang)

Ruan Jisheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Strain AS₂ was isolated from nodules of *Alnus sibirica* Fisch. The strain produces spherical or clavate sporangia and spherical vesicle. The strain belongs to CW Type III by their cell wall composition and sugar pattern Type D. Growth of strain AS₂ is stimulated by the synergic action between Tween-80 and glucose in S medium, therefore it belongs

to physiological Type B. Its G+C content of DNA is 77.34 mol % (Tm). We considered this strain as a member of *Frankia* sp. AS₂.

Key words

Alnus sibirica; *Frankia*