

# 由同种宿主植物分离的两个 *Frankia* 菌株差异性的研究

袁长芳

(山西省生物研究所,太原)

由同一个地点、同一种宿主植物——翅果油树 (*Elaeagnus mollis* Diels) 的根瘤中获得两个菌株, *Frankia* sp. Eml 108 和 Eml 131。形态观察结果表明,它们具有典型的 *Frankia* 结构,但在细胞色素,纯培养的固氮酶活性,侵染原宿主的能力,营养需求等方面均明显不同。

**关键词** 弗兰克氏菌;翅果油树

根据目前记载,世界上非豆科结瘤植物有 200 余种,而多数尚未分离出纯培养菌株。在已知菌株中,已有从同一地区、同一种宿主植物(如香蕨木或桉木)根瘤中,分离出两种形态、生理、生化、血清学及侵染能力不同的菌株<sup>[1-4]</sup>。而在其它种宿主植物中,尚未见类似报道。作者研究了由翅果油树根瘤中分离的两个 *Frankia* 菌株的生理生化差异性,现报道如下。

## 材料和方法

### (一) 试验菌株

翅果油树 (*Elaeagnus mollis* Diels) 的根瘤采自山西省翼城县甘泉林场的翅果油树林地。根瘤水洗后,经四氧化锇表面灭菌, QMod<sup>[5]</sup> 培养基中液体培养,获得 *Frankia* sp. Eml 108 和 Eml 131 两菌株,回接宿主均具侵染能力。

### (二) 生理试验

菌株保藏与培养均在 TB<sup>[6]</sup> 培养液中进行,生长与发育良好。菌株在不同培养基、不同碳中生长试验的方法参照前文报道的进行<sup>[7,8]</sup>。菌体生长量,以菌体蛋白量计算。菌体蛋白定量分析方法参照 Lowry 等人的方法<sup>[9]</sup>进行。

### (三) DNA 中 (G + C) mol% 的测定

按林万明等人的方法<sup>[10]</sup>进行。

### (四) 培养液

试验所用培养液有 TB<sup>[6]</sup>, QMod<sup>[5]</sup>, QMod/

Tween<sup>[11]</sup>, Tween/Cas<sup>[11]</sup>, PAM<sup>[12]</sup>, PMC<sup>[13]</sup>, YCZ<sup>[14]</sup>。

## 结果和讨论

### (一) 菌株形态

两菌株均具有典型的 *Frankia* 菌体特征,即菌丝分枝,分隔,孢囊顶生或间生,形成顶囊。但是,菌株 Eml 108 在 TB 或 QMod 培养液中培养两周以上,形成大量孢囊,成熟的孢囊呈赭石色,而菌株 Eml 131 形成孢囊数量很少且无色。

两菌株在 TB 培养液中生长,两周以内菌体几乎都无色。此后,随菌龄增加,菌株 Eml 108 逐渐显示颜色,至 1 月龄,菌体可呈赭石色(图版 I-1 及 I-2a),而相同菌龄的菌株 Eml 131 则无色(图版 I-2b)。经过离心,洗涤后的菌体颜色如图版 I-4。显然,菌株 Eml 108 菌体颜色的形成与孢囊的形成和发育密切相关,成熟的孢囊和孢子具有色素,而菌株 Eml 131 则没有。

### (二) 生理特性

1. 两菌株在不同培养液中生长情况的比较: 两菌株同时接种到下列不同培养液中,培养条件完全相同,生长 1 月后,测定

本文于 1987 年 10 月 26 日收到。

菌体生长量(以每 15 ml 培养液中菌体蛋白量为单位), 结果见表 1。每一组合设 5 个重复, 取其平均值。

表 1 两个菌株在不同培养液中生长的比较  
Table 1 Comparison of growth of *Frankia* sp. Eml108 and Eml131 in various medium

培养基 Medium	碳源 Carbon source	菌体生长量 Cell growth yield ( $\mu\text{g}$ cell protein/15ml)	
		Eml 108	Eml 131
TB	葡萄糖 glucose	929.68	24.60
QMod	葡萄糖 glucose	747.84	25.38
QMod/Tween	葡萄糖+吐温 80 glucose+ Tween	8.20	13.12
Tween/Cas	吐温 80 tween 80	306.68	265.68
PAM	丙酸 propionic acid	167.28	86.92
FMC	丙酮酸 pyruvic acid	7.19	15.46
YCZ	蔗糖 sucrose	33.89	35.26

表 1 结果表明, 菌株 Eml 108 最适培养液为 TB, QMod, Tween/Cas 和 PAM, 而菌株 Eml 131 只有在 Tween/Cas 中生长较好, PAM 次之, 与菌株 Eml 108 相比, 则生长均较差。

2. 在不同碳源中生长情况的比较: 在基础培养液<sup>[7,8]</sup>中, 氮源加  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 碳源如表 2 所示, 接种、培养与测定均同前述, 培养 1 月后的生长情况见表 2。

表 2 结果表明, 菌株 Eml 108 利用葡萄糖最佳, 丙酸或吐温 80 次之, 而菌株 Eml 131 则利用葡萄糖或吐温 80 较差, 只能利用乙酸、丙酸和蔗糖。

3. 葡萄糖和吐温 80 的相互作用: 在 TB 培养液中, 改变葡萄糖的浓度, 或在改变葡萄糖浓度的同时加入 0.2% 的吐温 80, 培养不同时间后, 测定生长量, 结果见

表 2 不同碳源对两个菌株生长的影响

Table 2 The effect of various carbon sources on growth of *Frankia* sp. Eml108 and Eml 131

碳源 Carbon sources	浓度 Concentration (g/L)	菌体生长量 Cell growth yield ( $\mu\text{g}$ cell protein/15ml)	
		Eml 108	Eml 131
葡萄糖 Glucose	10.0	385.40	18.58
蔗糖 Sucrose	10.0	56.85	77.62
麦芽糖 Maltose	10.0	45.92	17.65
反丁烯二酸 Fumaric acid	1.0	9.48	24.38
乙酸 Acetate acid	1.0	13.12	109.33
丙酸 Propionic acid	0.5	260.76	108.24
丙酮酸 Pyruvic acid	1.0	23.16	21.53
琥珀酸 Succinic acid	1.0	15.30	51.38
吐温 80 Tween 80	2.0	104.96	43.73
无碳源 Free carbon source	0.0	10.93	8.74

图 1。

将图 1-A1 和 B1 相比较, 说明菌株 Eml 108 对葡萄糖的利用较好, 而菌株 Eml 131 利用较差。此外还表明 1% 的葡萄糖优于 2%。

图 1-A2 表明, 在加有葡萄糖的培养基中, 加入 0.2% 的吐温 80, 明显地抑制了菌株 Eml 108 的生长。其生长量大大低于以葡萄糖或吐温 80 作为唯一碳源。菌株 Eml 131 由于对葡萄糖或吐温 80 利用均差, 在图 1-B2 中没有明显地抑制或促进作用。Lechevalier<sup>[13]</sup> 曾提出将 *Frankia* 菌株划分为 A 和 B 生理群, 以此标准衡量, 菌株 Eml 108 近于 A 群。而菌株 Eml 131 既不能属 A 群, 也不能属 B 群, 因为它对吐温 80 或葡萄糖利用不佳, 同时加入时抑制或促进生长的反应不明显。

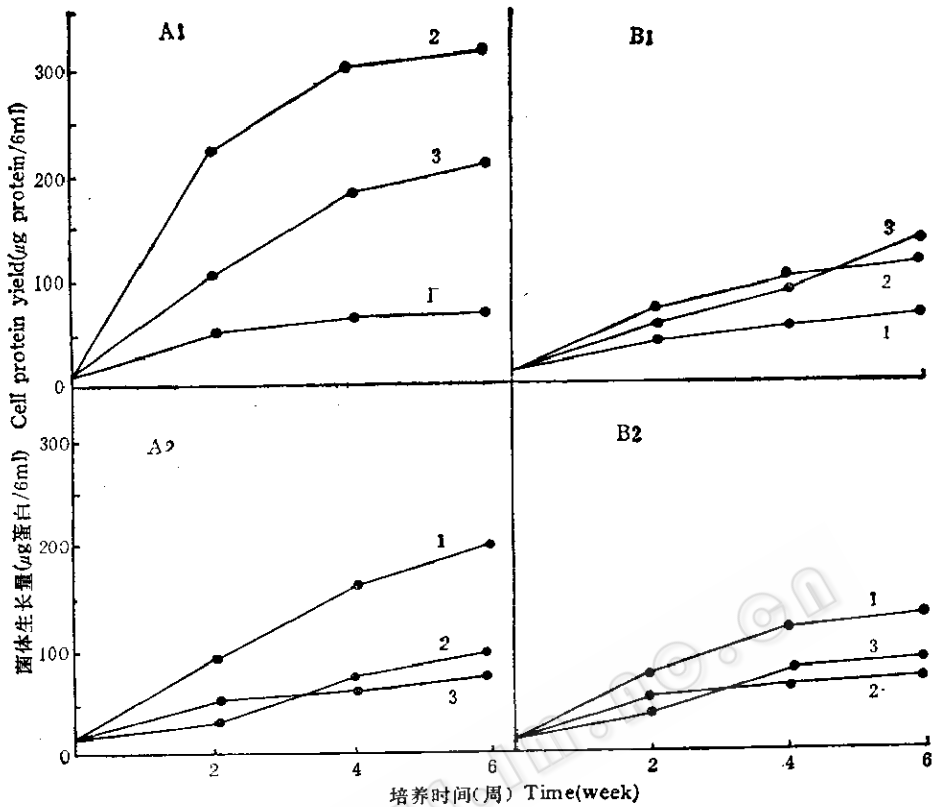


图1 葡萄糖和吐温 80 对菌株 Eml 108 和 Eml 131 生长的影响

A1. 菌株 Eml 108 在 TB 培养液中的生长; A2. 菌株 Eml 108 在 TB + Tween 80 培养液中的生长; B1. 菌株 Eml 131 在 TB 培养液中的生长; B2. 菌株 Eml 131 在 TB + Tween 80 培养液中的生长。

1. 无葡萄糖; 2. 1% 葡萄糖; 3. 2% 葡萄糖。

Fig. 1 Influence of tween 80 and glucose on growth of *Frankia* sp. Eml 108 and Eml 131 in TB medium

A1. Eml 108 in TB medium; A2. Eml 108 in TB + Tween medium; B1. Eml 131 in TB medium; B2. Eml 131 in TB + Tween medium.

1. No glucose; 2. 1% glucose; 3. 2% glucose.

### (三) 两菌株生化特性的差异

1. 纯培养的固氮酶活性: 用无氮诱导培养液, 以丙酸作为碳源, 诱导培养 7—14 d, 测定菌株的固氮酶活性(乙炔还原法)。菌株 Eml 108 最高活性可达  $35.45 \text{ n mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ 蛋白} \cdot \text{h}^{-1}$ , 而菌株 Eml 131 则测不出固氮酶活性。镜检结果表明, 经过无氮诱导培养的菌株 Eml 108, 有大量的固氮顶囊形成, 而菌株 Eml 131 顶囊的数量很少, 故测不出活性。

2. DNA 中 (G + C) mol %: 用林万明等人的方法<sup>[10]</sup>测定提纯后的 DNA 中 G + C 含量, 以大肠杆菌 (*Escherichia coli* K 12) 作为测定标准菌株。结果表明, 两菌株的 DNA G + C 含量差异不大, 菌株 Eml 108 和 Eml 131 分别为 67.34 和 66.12 mol %。

### (四) 对宿主侵染的差异

用两菌株纯培养分别回接宿主, 结果表明, 在宿主植物培养条件相同的情况下,

菌株 EmI 108 结瘤数目大大高于菌株 EmI 131 (图版 I-3), 所形成根瘤的固氮活性尚未测定。

### 参 考 文 献

- [1] Lechevalier, M. P. et al.: *Can. J. Bot.*, **61**: 2826—2833, 1983.
- [2] Lechevalier, M. P. et al.: *Plant and Soil*, **78**: 15—22, 1984.
- [3] Fanzia, H. et al.: *ibid.*, **78**: 45—49, 1984.
- [4] Horriere, F. M. et al.: *Can. J. Bot.*, **61**: 2843—2854, 1983.
- [5] Lalonde, M. et al.: In *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests* (ed. by Gordon, J. C. et al.), Oregon State University Press, Oregon, pp. 95—110, 1979.
- [6] Murggraaf, A. J. P. et al.: *Plant and Soil*, **61**: 157—168, 1981.
- [7] 袁长芳: *微生物学报*, **27**(2): 110—115, 1987.
- [8] 袁长芳: *微生物学报*, **27**(1): 64—68, 1987.
- [9] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275, 1951.
- [10] 林万明等: *微生物学通报*, **8**(5): 215—216, 1981.
- [11] Blom, J. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**: 131—135, 1980.
- [12] Shipton, W. A. et al.: *Plant and Soil*, **69**: 149—161, 1982.
- [13] Benson, D. R.: *Applied and Environ. Microbiol.*, **44**(2): 461—465, 1982.
- [14] Baker, D. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **26**: 1072—1089, 1980.
- [15] Lechevalier, M.: *Plant and Soil*, **78**: 1—6, 1984.

## STUDIES ON DIVERSITY OF TWO *FRANKIA* SP. ISOLATED FROM SAME HOST PLANT

Yuan Changfang

(Shanxi Institute of Biology, Taiyuan)

Two strains, *Frankia* sp. EmI 108 and EmI 131, were obtained from root nodules of *Elaeagnus mollis* Diels, collected from one locality. The morphological observation showed they have typical structure for *Frankia*. The strains differed in their production of

cellular pigments, nitrogen-fixing ability, infective ability on original host and growth requirements.

### Key words

*Frankia*; *Elaeagnus mollis* Diels

### 图 版 说 明

#### Explanation of plate

1. 菌株 EmI 108 细胞色素的形成。1a. 1 周培养; 1b. 两周; 1c. 4 周。
  2. 两菌株培养 1 月后的色素。2a. 菌株 EmI 108; 2b. 菌株 EmI 131。
  3. 两菌株对宿主的侵染。3a. 菌株 EmI 108; 3b. 菌株 EmI 131。
  4. 离心, 洗涤后的菌体颜色。4a. 菌株 EmI 108; 4b. 菌株 EmI 131。
1. Producing of cellular pigments with growth days of EmI 108.  
1a. one week; 1b. two weeks; 1c. four weeks.
  2. Cultural pigment after growth one month.  
2a. strain EmI 108; 2b. strain EmI 131.
  3. Infective on host plant.  
3a. strain EmI 108; 3b. strain EmI 131.
  4. Cellular pigments of endophyte centrifuged and cleaned.  
4a. strain EmI 108; 4b. EmI 131.