

## 弗兰克氏菌的 G+C 含量和 DNA 杂交

石彦林 阮继生

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

Jolanta Zakrzewska-Czerwinska Marian Mordarski

(波兰科学院免疫和化疗研究所, 弗罗茨瓦夫)

对一些弗兰克氏菌的遗传和生理特性进行了研究。结果表明, 7 株菌可以分为 3 个基因群。从木麻黄 (*Casuarina equisetifolia*) 分离的菌株可以划为一个基因群 (与菌株 S-103 的 DNA 同源性在 74% 以上), 这是国外尚未报道的新基因群。其他两株弗兰克氏菌菌株 Ar14 (从赤杨根瘤分离) 和 Pt11 (从 *Purshia* 根瘤分离) 分别形成另外两个基因群, 这与 An 的报道一致。7 株弗兰克氏菌 DNA 的 G+C mol% 在 69—73。S-103 基因群菌株不利用糖类, 仅利用简单的有机酸盐。而菌株 Ar14 和 Pt11 则利用一些糖和有机酸盐作为碳源。

**关键词** 弗兰克氏菌; DNA 同源性

自 1978 年从香蕨木 (*Comptonia*) 植物根瘤分离出内生菌以来<sup>[1]</sup>, 从各种寄主植物根瘤中分离到大量菌株。许多菌株已被各国科学家进行了广泛研究<sup>[2-7]</sup>。弗兰克氏菌的定属标准已被公认, 但弗兰克氏菌属内种的划分还是一个悬而未决的难题。本文的目的在于探讨 DNA 杂交在弗兰克氏菌属内分种的可行性。

### 材料和方法

#### (一) 菌株和培养条件

菌株 S-101、S-103、S-105、K114、Ce24 分离自云南和广州的木麻黄的根瘤。菌株 L27 和 G48 分别分离自福建的罗汉松和竹柏的根瘤。根瘤先用 30%  $H_2O_2$  或 0.1%  $HgCl_2$  表面消毒 10—20 分钟。然后用无菌水洗 3—4 次, 用无菌刀切成小片, 放入 BAP 液体培养基中, 28℃ 培养 1 个月以后, 显微镜下镜检。Ar14 和 Pt11 是由美国 Baker 博士提供。放线菌 A51 (*Actinoplanes italicus*) 和链霉菌 A002 (*Streptomyces avidinii*) 来自中国科学院微生物

研究所菌种保藏室。

7 株弗兰克氏菌和 2 株从罗汉松和竹柏分离菌 (L27 和 G48) 在 BAP 液体培养基中, 28℃ 培养 3—4 周, 收集菌体。菌株 A002 和 A51 在修改的 Sauton's 培养基<sup>[8]</sup>中, 28℃ 分别培养 2 天和 6 天, 收集菌体。

#### (二) DNA 提取

10g 菌体加 20ml (0.03mol/L Tris-HCl + 0.1mol/L EDTA pH8.0) 缓冲液, 再加 50mg 溶菌酶。菌悬液通过 French press (10,000psi)。此菌液在 37℃ 培养过夜。用 SDS 调至 2% 终浓度。60℃ 保温 30 分钟, 以后的步骤同 Mordarski<sup>[9]</sup> 和 Zakrzewska-Czerwinska<sup>[10]</sup>。

#### (三) DNA 的 G+C mol% 测定

DNA G+C mol% 含量按 Marmur 和 Doty 方法<sup>[11]</sup>测定。

本文于 1991 年 1 月 17 日收到。

本课题得到中国国家科委、波兰科学院免疫与化疗研究所的资助, 以及国家自然科学基金的部分资助。

表 1 菌株来源  
Table 1 Strains used in this study

菌株 Strains	寄主植物 Source host	采集地点 Geographical origin
Ar14	赤杨 <i>Alnus rubra</i>	美国 United State
K114	木麻黄 <i>Casuarina equisetifolia</i>	云南 Yunnan
S-101	木麻黄 <i>Casuarina equisetifolia</i>	广东 Guangdong
S-103	木麻黄 <i>Casuarina equisetifolia</i>	广东 Guangdong
Ces	木麻黄 <i>Casuarina equisetifolia</i>	广东 Guangdong
Ce24	木麻黄 <i>Casuarina equisetifolia</i>	广东 Guangdong
Pt11	* <i>Purshia tridentata</i>	美国 United State
L27	罗汉松 <i>Podocarpus macrophylla</i>	福建 Fujian
G48	竹柏 <i>Podocarpus nagi</i>	福建 Fujian

\* 我国无此树种。

#### (四) DNA 杂交

参考菌株 (S-103, Ar14, Pt11 和 G48) 的 DNA 同位素标记是用试管内 Nick translation 方法获得。使用  $^3\text{H}$  标记的胞嘧啶三核苷酸 (66Ci/m mol, Amersham, U. K)。DNA 探针平均活性 5000000cpm/ $\mu\text{g}$ 。膜上 DNA 含量测定用 Buton 方法<sup>[12]</sup>。DNA-DNA 杂交使用滤膜法<sup>[13]</sup>。杂交条件是: 用 200 $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$  标记的 DNA (在 3SSC 中含 35% 的甲酰胺) 与含 7—10  $\mu\text{g}$  DNA 的滤膜在 60 $^{\circ}\text{C}$  保温复性 24 小时。然后测定膜上同位素含量, 计算出 DNA 同源百分率。

#### (五) 生理特性

将 0.5% 的各种有机酸盐或 0.1% 的糖类分别加入基础培养基中 (BAP 培养基去掉丙酸钠)。试验菌在 28 $^{\circ}\text{C}$  培养 1 个月观察生长情况。

## 结 果

#### (一) 形态

所有从木麻黄根瘤分离的菌株和菌株 Ar14、Pt11 都有典型的分枝状菌丝, 在菌丝的中间或末端产生孢囊, 大小和形状不定。孢囊孢子由纵横隔分裂形成, 有时在菌丝末端形成球形孢囊。L27 和 G48 具

有较小的孢囊和孢子, 在形态上与典型弗兰克氏菌不同。

#### (二) DNA 的 G + C mol%

弗兰克氏菌的 DNA G + C 含量在 69—73mol% 之间 (表 2)。这与以前文献报道的相近<sup>[2]</sup>。对照菌株 A51 和 A002 也与以前报道的一致。菌株 L27 和 G48 与其它试验菌株的 DNA G + C 含量无明显差异 (72.5mol% 和 74.4mol%)。

#### (三) DNA-DNA 杂交

用 4 个参考菌株的标记 DNA 与其它菌株的 DNA 杂交结果表明, 从木麻黄根瘤分离的菌株 Ce24、K114、S-101、Ces 与标记菌 S-103 的 DNA 有很高的同源性 (74% 以上)。而与其它菌 (Ar14、Pt11 和 G48) 的标记 DNA 同源性很低 (17% 以下)。从罗汉松和竹柏根瘤分离的两株菌 (G48 和 L27) 的 DNA 之间有很高的同源性 (70%), 而其它两株弗兰克氏菌 Ar11 和 Pt11 的 DNA 在它们之间或与菌株 S-103、G48 之间的同源性较低 (17% 以下)。从表 2 可以看出 S-103、Ar14、Pt11 和 G48 四个标记菌株 DNA 代表了四个不同的基因群。两个对照菌 A51 和 A002 与四个标记菌 DNA 的同源性都很低 (13% 以下)。

#### (四) 生理特性

从表 3 可以看出, 根据对碳源利用的能力, 9 株菌可以分为 3 个群, 第一群菌不利用任何糖类, 只利用一些简单的有机酸盐(乙酸钠, 丙酸钠)。这群菌都是 S-103 基因群菌株, 它们来自木麻黄根瘤。第二群菌利用某些糖(如葡萄糖, 蔗糖)和有机酸盐, 菌株 Ar14 和 Pt11 属于这群菌。第三群菌能利用大多数试验中的糖和有机酸盐, 它们是菌株 L27 和 G48。

### 讨 论

美国的 An 等人在 1985 年用 DNA 杂交法把弗兰克氏菌分为两个基因群。第 1 群菌与菌株 Ar14 的 DNA 同源性很高。第 2 群菌与菌株 Ar14 的 DNA 同源性很低<sup>[2]</sup>。从我们的结果可以看出, 除菌株 Ar14 以外, 本试验的其它菌株都不属于 An 的第 1 群菌, 应属于 An 的第 2 群菌。但在第 2 群里还应分更多的基因群, 由于 S-103 基因群菌株与菌株 Pt11 间

表 2 试验菌株的 DNA G+C mol% 和 DNA 同源性

Table 2 DNA G+C mol% and homology among tested strains

菌株 Strains	G+C mol%	DNA 同源性 DNA homology(%)			
		S-103	Ar14	Pt11	G48
S-103	71.2	100	17	12	6
Ce24	70.3	100	15	13	8
K114		98	15	8	
S-101	70.3	76	14	12	6
Ces	69.3	74	13	9	6
Ar14	71.2	17	100	16	8
Pt11	73.4	7	9	100	6
L27	72.5	5	7	10	70
G48	74.4	5	5	8	100
A51	69.3	3	5	9	13
A002	71.0	3	5	10	7

DNA 同源性很低, 它们应属于不同的基因群。也就是说, 本实验中的弗兰克氏菌可以分为 3 个基因群: Ar14 基因群, Pt11 基因群和 S-103 基因群。其中 S-103 基因群是国外尚未报道的新基因群, 它们分

表 3 试验菌株的碳源利用

Table 3 Carbohydrate utilization by tested strains

菌株 Strains	G1	F	G2	R	M1	M2	S1	A1	MG	A2	P1	S2	M3	B	C
K114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
S-101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0
S-103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0
Ces	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0
Ce24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0
Ar14	2	0	0	2	2	0	2	0	0	2	3	0	0	0	0
Pt11	2	0	0	0	2	0	2	0	2	2	2	0	0	0	0
L27	2	2	2	0	2	2	2	0	2	3	3	0	2	0	0
G48	2	0	2	0	2	2	2	0	2	3	3	0	2	0	0

注: 0. 不生长; 1. 少量生长; 2. 生长; 3. 生长好。

G1. 葡萄糖; F. 果糖; G2. 半乳糖; R. 鼠李糖; M1. 甘露糖; M2. 麦芽糖; S1. 蔗糖; A1. 阿拉伯糖; MG. 3-0-甲基-葡萄糖 A2. 乙酸钠; P. 丙酸钠; S2. 丁二酸钠; M3. 苹果酸钠; B. 苯甲酸钠; C. 对照。  
0. No growth; 1. Poor growth; 2. Fair growth; 3. Good growth.

G1. Glucose; F. Fructose; G2. D-galactose; R. L-rhamnose; M1. D-mannose; M2. Maltose; S1. Sucrose; A1. L-arabinose; MG. 3-0-methyl-D-glucose; A2. Sodium acetate; P. Sodium propionate; S2. Sodium succinate; M3. Sodium DL-malate; B. Benzoate; C. Control.

别来自我国云南和广东的木麻黄根瘤。G48 和 L27 两株菌从形态与 DNA-DNA 杂交的结果看来, 它们可能不属于弗兰克氏菌, 它们与弗兰克氏菌间的关系有待进一步研究。菌株的生理特性和寄主植物与 DNA 同源性表现出一定的相关性。而菌株间的地理差异并没有表现在 DNA 同源性上。DNA G + C 含量在这些菌的区分上很难起作用。如果以后用更多的弗兰克氏菌进行 DNA 同源性研究, 将会发现更多的基因群, 这些基因群的发现将会为弗兰克氏菌定种提供重要的参考作用。

### 参 考 文 献

- [1] Callahan, D. et al.: *Science*, **199**: 899-902, 1978.
- [2] An, C. S. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**:140-146, 1985.
- [3] Baker, D. and K. Huss-Danell: *Arch. Microbiol.*, **144**:233-236, 1986.
- [4] Baker, D.: *Physiol. Plantarum.*, **70**: 245-248, 1987.
- [5] Lechevalier, M. P. et al.: *Can. J. Bot.*, **61**: 2826-2833, 1983.
- [6] Lechevalier, M. P.: *Plant Soil*, **78**: 1-6, 1984.
- [7] Murry, M. A.: *ibid.*, **78**:61-78, 1984.
- [8] Mordarska, H.: *J. Gen. Microbiol.*, **71**:77-86, 1972.
- [9] Mordarski, M.: *ibid.*, **94**: 235-245, 1976.
- [10] Zakrzewska-Czerwinska, J.: *J. Gen. Microbiol.*, **134**:2807-2813, 1988.
- [11] Marmur, J. and P. Doty: *J. Molec. Biol.*, **5**:109-118, 1962.
- [12] Burton, K.: *Methods Enzymol.*, **12 B**:163-166, 1968.
- [13] Stackebrandt, E.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **31**:420-431, 1981.

## DNA BASE COMPOSITION AND HOMOLGY VALUES IN THE CLASSIFICATION OF SOME FRANKIA STRAINS

Shi Yanlin Ruan Jisheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Jolanta Zakrzewska-Czerwinska Marian Mordarski

(*Institute of Immunology and Experimental Therapy, Poland, Wroclaw*)

The genotypic and phenotypic properties of some *Frankia* strains were established. The results of DNA homology indicated that seven tested *Frankia* strains should be divided into three genetic groups. *Frankia* strains isolated from *Casuarina equisetifolia* should be classified into one genetic group (74 to 100% related to strain S-103), which have not been reported before. Other two *Frankia* strains, Ar14 and Pt11 isolated from *Alnus* and *Purshia* respectively formed two

distinct genetic group, which agree with An's report. The guanine plus cytosine contents of the DNA of seven *Frankia* strains ranged from 69 to 73 mol%. Strains from S-103 genetic group did not utilize sugars, only simple organic acids were utilized as a carbon sources. Strains Ar14 and Pt11 utilized sugars as well as organic acids.

### Key words

*Frankia*; DNA homology