

Frankia 与链霉菌融合子特性的研究

邹 铎 弥铁隽¹ 张忠泽 苏凤岩 郝东梅² 王育英 丁 鉴

(中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110015)

(¹ 沈阳医学院生化教研室 沈阳 110031)

(² 中国医科大学分子遗传室 沈阳 110001)

摘 要 将 *Frankia* 菌株 Cc01 与金色链霉菌 GL 原生质体融合,得到 3 株融合子,均具有 GL 生长快的特性与 Cc01 的结瘤固氮能力。固体培养时,3 株融合子呈现出与 GL 不同的颜色;且均具有 *Frankia* 菌的顶囊形态,以及链霉菌的链状孢子丝结构。与两亲本相同,3 株融合子均对大肠杆菌有抗性,其中 F4 与 GL 的抗菌谱基本相同。在传 10 代之后,它们仍具有结瘤与固氮能力。血清学分析表明,F1 与 F6 兼具两亲本的特异抗原,而 F4 仅具有 GL 的特异抗原,融合子 F1、F6 较 F4 在遗传上更为稳定。

关键词 *Frankia*, 链霉菌, 融合子

Frankia 是一类可与 8 科 24 属植物形成固氮共生体的放线菌,在造林,以及结瘤、固氮、遗传等研究方面均具有重要价值。然而这类菌生长缓慢,且几乎不能在固体培养基上生长,这给研究与应用工作带来了许多困难。为解决这一问题,用细胞融合技术将 *Frankia* 菌与其亲缘关系较近且生长快的金色链霉菌 (*Streptomyces aureus*) 融合,构建新型快生型固氮放线菌。作者对所得到的 3 株融合子的特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 亲本菌株与融合子

1.1.1 亲本菌株: *Frankia* 菌株 Cc01 从广东细枝木麻黄 (*Casuarina cunninghamiana*) 根瘤中分离得到^[1];金色链霉菌 (*Streptomyces aureus*) GL 从辽宁省西部土壤中分离得到。

1.1.2 融合子: F1, F4, F6 系本组通过 Cc01 及 GL 原生质体融合而得。首先将 *Frankia* 菌株 Cc01 与金色链霉菌 GL 用溶菌酶处理,制备原生质体,再将原生质体融合,在促融剂 PEG6000 的作用下形成融合子,在 Km、Tc 双抗平板上选择单菌落, Cc01 抗 Km 而对 Tc 敏感, GL 抗 Tc 对 Km 敏感,因此双抗平板上的菌落应为融合子。

1.2 形态观察

融合子分别用 Km、Tc 双抗液体或固体再生培养基^[2]、高氏 1 号、Bap 培养基^[3]传代,记录传代次数。观察菌落和菌丝体形态。

1.3 固氮酶活性

将经传 10 代的融合子及亲本接到无氮 Bap 培养基中, 28℃ 培养一周, 再将其转入 Bap 液体培养基内, 振荡培养, 定时取样, 用乙炔还原法测固氮活性^[4]。

1.4 抗菌谱测定

1.4.1 测试菌:

细菌: 枯草杆菌 *Bacillus subtilis* G⁺。金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* G⁺。大肠杆菌 *Escherichia coli* G⁻。

酵母: *Saccharomyces cerevisiae*。

真菌: 见表 1。

表 1 供试致病真菌

Table 1 The pathogenic fungus used in the test

菌种 Strains	寄主 Host of a parasite
须壳孢属 <i>pyrenochaeta</i>	亚麻 <i>Linum usitatissimum</i>
小菌核菌属 <i>Sclerotium</i>	甜菜 <i>Beta vulgaris</i>
菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	油菜 <i>Brassica campestris</i>
玉米胡麻斑菌 <i>Cochliobolus heterostrophus</i>	玉米 <i>Zea mays</i>
稻胡麻斑菌 <i>Cochliobolus miyabeanus</i>	水稻 <i>Oryza sativa</i>
稻恶苗霉 <i>Fusarium moniliforme</i>	水稻 <i>Oryza sativa</i>
枇杷轮斑盘多毛孢菌 <i>Pestalotia funerea</i>	人参 <i>Panax ginseng</i>

上述测试菌均由本所菌种组提供。

细菌用肉汤培养基^[5], 酵母和真菌用 PDA 培养基培养^[5]。

1.4.2 测定方法: 用稀释平板法将测试菌接种到相应的平板上, 每个平板分成 5 等分。取一定大小的圆滤纸片, 分别在培养 20 天左右的 Cc01、GL、F1、F4、F6 菌液中浸泡片刻后, 取出置于平板的相应区域, 倒置培养。细菌 37℃ 培养 1 天, 酵母和真菌 28℃ 培养 3 天, 观察抑菌情况, 重复 5 次。

1.5 结瘤试验

选取 Cc01 宿主植物细枝木麻黄幼苗, 分别用亲本及融合子接种, 每株菌接种幼苗 18 棵。试管玻片法培养^[6], 定时观察结瘤情况。

1.6 血清学检测

用 Bap 培养基培养亲本及融合子一周, 离心收集菌体, 无菌生理盐水洗涤 3 次, 超声波破碎, 14000r/min 离心 30 分钟, 上清液为菌体可溶性蛋白抗原。福林-酚法^[7]测蛋白含量约 1mg/ml 左右。用二亲本 Cc01 及 GL 抗原分别免疫家兔, 由中国医科大学免疫研究室协助制备抗血清。用 Cc01 抗原彻底吸收 GL 抗血清, 用 GL 抗原吸收 Cc01 抗血清, 以去除干扰抗体。将抗原分别用生理盐水稀释至 1/4, 1/8, 1/16, 逐一与 2 亲本及 3 株融合子抗原进行双向琼脂糖扩散试验, 观察沉淀线出现情况。

2 结果

2.1 融合子形态

2.1.1 固体培养特征: 融合子可在多种固体培养基上生长, 培养特征见表 2。

表 2 菌株 GL 与融合子 F1, F4, F6 的固体培养特征

Table 2 Culture character of strain GL and fusants F1, F4, F6 on the solid media

菌株 Strains	再生及高氏 1 号培养基 Regeneration and Gauze 1 media	Bap 有氮培养基 Bap-NH ₄ +medium	Bap 无氮培养基 Bap N free medium
GL	气丝灰白, 基丝深灰色, 无胞外色素 aerial mycelia white grey, vegetative mycelia dark gray, no pigment	气丝灰白, 基丝白色, 无胞外色素 aerial mycelia white grey, vegetative mycelia white gray, no pigment	白色小菌落, 生长缓慢 white small cloning, growing slowly
F1	气丝粉红, 基丝白色, 无胞外色素 aerial mycelia pink, vegetative mycelia white, no pigment	气丝粉红, 基丝白色, 无胞外色素 aerial mycelia pink, vegetative mycelia white, no pigment	气丝及基丝白色, 无胞外色素 aerial and vegetative, mycelia white, no pigment
F4	气丝及基丝褐色, 胞外色素褐色 aerial and vegetative, mycelia brown, pigment brown	气丝及基丝浅褐色, 无胞外色素 aerial and vegetative mycelia light brown, no pigment	气丝浅褐, 基丝白色, 无胞外色素 aerial mycelia light brown, vegetative mycelia white, no pigment
F6	气丝粉色, 基丝白色, 无胞外色素 aerial mycelia pink, vegetative mycelia white, no pigment	气丝粉色, 基丝白色, 无胞外色素 aerial mycelia pink, vegetative mycelia white, no pigment	气丝及基丝白色, 无胞外色素 aerial and vegetative, mycelia white, no pigment

Cc01 在固体培养基上不生长。F1、F4 及 F6 在再生及高氏一号培养基上 4 天可长满斜面, GL 则需 3 天。上述菌株在 Bap 有氮培养基上 1 周长出菌落, 在 Bap 无氮培养基上则需 2 周。与亲本 GL 相同, 所有融合子菌落都较干燥坚硬, 具有链霉菌菌落特征。

2.1.2 显微形态: 3 株融合子在无氮 Bap 培养基中生长时, 都具有 *Frankia* 菌的典型形态——顶囊和孢子囊, 但数量少, 且顶囊形状小于 Cc01 的顶囊(图版 I)。3 株融合子也具有链霉菌的显微形态, 如具有链状孢子丝(图版 I)。

2.2 固氮酶活性

Frankia 菌株 Cc01 与 3 株融合子的固氮活性见表 3。

表 3 *Frankia* 菌株 Cc01 与融合子 F1, F4, F6 的固氮酶活性(nmol C₂H₄/mg protein. h)

Table 3 N₂ase activities of *Frankia* strain Cc01 and the fusants F1, F4, F6

菌株 Strain	培养时间(d) Culture time									
	1	3	4	5	6	8	10	11	12	13
Cc01	12.03	17.10	19.58	15.95	7.10	2.05	1.90	1.83	-	-
F1	0	0	0	-	-	5.90	8.68	12.59	13.57	11.47
F4	0	0	0	-	-	2.02	12.17	10.52	-	-
F6	0	4.78	15.22	10.47	7.26	3.43	2.18	1.55	-	-

注: -, 未测定 No measured

从表 3 可以看出, 3 株融合子 F1, F4, F6 都具有固氮活性, 但低于亲本 *Frankia*。链霉菌 GL 无固氮活性。

2.3 抗菌谱

F4 的抗菌特性与亲本 GL 相似,对 G⁻ 菌株和某些致病真菌有抗性,但效价比 GL 低。F1 和 F6 的抗菌谱与 Cc01 相同,只对 G⁻ 菌有抗性(表 4)。

表 4 亲本与 3 株融合子的抗菌谱

Table 4 The antibiogram of the patents and fusants

致病菌 Pathogenic microbe	GL	Cc01	F1	F4	F6
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
须壳孢属 <i>Pyrenochaeta</i>	++	-	-	+	-
小核菌属 <i>Sclerotium</i>	-	-	-	-	-
菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-	-	-	-	-
玉米胡麻斑菌 <i>Cochliobolus heterostrophus</i>	+	-	-	-	-
稻胡麻斑菌 <i>Cochliobolus miyabeanus</i>	++	-	-	+	-
稻恶苗霉 <i>Fusarium moniliforme</i>	-	-	-	-	-
枇杷轮斑盘多毛孢菌 <i>Pestalotia funerea</i>	++	-	-	+	-

注: - 无抑菌作用; + 有抑菌作用; ++ 强抑菌作用。

- No bacteriostasis; +. Bacteriostasis; ++. Powerful bacteriostasis.

2.4 结瘤能力

3 株融合子都能使细枝木麻黄结瘤,但结瘤率较低(表 5),且结瘤时间较长(约 45 天),而亲本 Cc01 在同样条件下结瘤率为 10%,结瘤时间约 20 天。所有根瘤均有固氮活性(表 5)。

表 5 融合子的结瘤率及根瘤的固氮活性

Table 5 Nodulation rate of the fusants and the N₂ase activities of the nodules

菌株 Strains	接种植株(株) Inoculated plants	结瘤植株(株) Nodulated plants	结瘤率(%) Nodulation rate	根瘤固氮活性 N ₂ ase activities of the nodules (nmol C ₂ H ₄ · g ⁻¹ · min ⁻¹)
F1	18	15	83.3	90.50
F4	18	10	55.6	115.61
F6	18	14	77.8	31.33
Cc01	18	18	100	21.73

2.5 融合子的血清学鉴定

3 株融合子蛋白抗原与 GL 蛋白抗体反应都能出现沉淀线, F1、F6 蛋白与 Cc01 抗体反应也能出现明显的沉淀线。Cc01 蛋白不与 GL 抗体反应, GL 蛋白也不与 Cc01 抗体反应(表 6), 说明两抗原中针对另一亲本蛋白的干扰抗体已被彻底吸收除掉。结果表明, 融合子 F1 与 F6 在传 13 代后仍含有两亲本的特异蛋白, 遗传上保持了较好的稳定性, 而 F4 则仅含有单一亲本 GL 的特异蛋白。

表 6 融合子的血清学分析

Table 6 Serological analysis of the fusants

抗血清 Antiserum	菌株蛋白 Protein of the strains				
	F1	F4	F6	Cc01	GL
Cc01	++	-	++	++	-
GL	+	++	+	-	++

3 讨 论

在形态上, 3 株融合子 F1、F4、F6 既有 *Frankia* 菌的典型形态——顶囊与孢子囊, 又有链霉菌的形态——链状孢子丝。在传代时, 培养基都加有 Km 和 Tc 两种抗菌素, 而 2 株亲本分别仅具有其中的一种抗性标记, 因此它们不可能是两种细胞的混合, 而是真正的融合子。3 株融合子都有两亲本的优良性状, 即链霉菌生长快的特性与 *Frankia* 菌的结瘤固氮能力, 是较为理想的融合子。

3 株融合子也具有一定的传代稳定性, 在传 10 代之后, 它们仍具有链霉菌生长快的特性, 以及具有 *Frankia* 菌的顶囊、孢子囊和结瘤固氮的能力。

3 株融合子与其亲本又均有不同之处, 如固体培养时, 菌落颜色与链霉菌 GL 差异很大, 且 F1、F6 抗菌谱也与 GL 不同; 3 株融合子的顶囊与孢子囊都比 Cc01 少, 且顶囊较小, 固氮与结瘤能力都不如 Cc01 强。这进一步证明了融合子的可靠性, 也提出了需进一步筛选结瘤固氮能力强的融合子。

与 F1 和 F6 相比, F4 除具有较强的结瘤固氮活性外, 还有与 GL 菌株类似的较广的抗菌谱, 能抑制某些植物致病真菌的生长。血清学分析表明, 传 13 代后 F1 和 F6 兼具两亲本 Cc01 和 GL 的特异抗原, 而 F4 仅具有单一亲本 GL 的特异抗原, 因此融合子 F1 和 F6 在遗传上更为稳定。

参 考 文 献

- [1] 李忠伟, 丁 鉴. 微生物学报, 1986, 26: 295—301.
- [2] Tisa I. S., Ensign J. C. *Appl Environ Microbiol.*, 1987, 53: 53—57.
- [3] Murry M A., Fontaine M S., Torrey J G. *Plant Soil*, 1984, 78: 61—78.
- [4] Zhang Z., Torrey J G. *Ann Bot.*, 1985, 56: 367—378.
- [5] 陈华葵. 微生物学实验, 北京: 农业出版社, 1962. 130—140.
- [6] 邹 桦, 丁 鉴, 苏凤岩. 植物生理学报, 1991, 17(3): 301—306.
- [7] 北京大学生物系生化教研室编. 生物化学实验指导, 北京: 人民教育出版社, 1982. 73—75.

STUDY OF THE CHARACTERISTICS OF THE FUSANTS FUSED BY *FRANKIA* STRAIN Cc01 AND *STREPTOMYCES AUREUS* STRAIN GL

Zou Hua Mi Tiejuan¹ Zhang Zhongze Su Fengyan

Hao Dongmei² Wang Yuying Ding Jina

(*Institute of Applied Ecology, Academia Sinica, Shenyang 110015*)

(¹*Shenyang Medical College, Shenyang 110031*)

(²*China Medical University, Shenyang 110001*)

Abstract Three fusants were obtained by fusing the protoplasts of *Frankia* strain Cc01 and *Streptomyces aureus* strain GL. All three fusants grew fast like GL, and could nodulate and fix nitrogen like that of strain Cc01. The colors of the hypha of the three fusants were different from their parent strain GL when they grew in agar media. All three fusants had vesicles which was the typical shape of *Frankia* strains, and chian spores like strain GL. They all had the antibacterial action to *E. coli* as their parents. Moreover, the antibiogram of fusant F4 was almost the same as its parent strain GL. Being transfered more than 10 times in the agar medium, all three fusants still had nodulation and nitrogen fixation abilities, but less than their parent Cc01. The serological analysis indicated that fusants F1 and F6 had both parents characteristic antigens, while fusant F4 had only the GL characteristic antigens. This suggested that fusants F1 and F6 were more stable in genetics and more believable.

Key words *Frankia*, *Streptomyces*, Fusants

图 版 说 明

Explanation of plate

融合子与 *Frankia* 菌的显微形态: 1. *Frankia* 菌株 Cc01 顶囊(960×); 2. Cc01 孢子囊(480×); 3. 融合子 F1 孢子囊(480×); 4. 融合子 F6 顶囊(480×); 5. 融合子 F4 孢子丝(480×)。

The micromorphology of the fusants and *Frankia* strain: 1. Vesicles of *Frankia* strain Cc01; 2. Sporange of strain Cc01; 3. Sporange of fusant F1; 4. Vesicle of funsant F6; 5. Chain spores of fusant F4.