

木麻黄根瘤中分离的四株弗兰克氏菌的比较研究

王晨光

阮继生 石彦林

(河北省科学院微生物研究所, 保定 071051)

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 用根瘤切片培养法, 从采自云南省的木麻黄 (*Casuarina equisetifolia*) 植物根瘤中分离出 K114 和 K105 二株弗兰克氏菌 (*Frankia*)。它们与另外二株来自广东省的同一种木麻黄根瘤分离菌 S-65 和 Ce24 进行比较: 四株菌的全细胞壁化学组分相同, 全细胞氨基酸都含有 meso-DAP; 全细胞糖型均为 D 型。但它们在菌丝和孢囊形态、色素产生以及固氮酶活性等方面均存在差异。其中 S-65 与另三株菌在碳源利用方面存在显著差异:

S-65 属于生理 A 型菌；另三株菌则属于生理 B 型菌，说明同一种寄主植物分离菌存在有差异菌株，而地域环境条件对菌株差异无显著影响。

关键词 *Frankia*; *Casuarina equisetifolia*; 生理; 固氮酶

木麻黄 (*Casuarina* spp.) 植物具有耐盐碱等特性，在改良土壤、营造材林等方面具有重要价值^[1]。目前，国内外已从多种木麻黄根瘤中分离出许多弗兰克氏菌^[2]。已有报道从同一地域、同种寄主植物（如香蕨木、赤杨、胡颓子等）根瘤中，分离出在形态、生理生化、固氮能力以及侵染性等方面存在差异的弗兰克氏菌^[3-6]。本文对分离自同一种木麻黄根瘤的四株弗兰克氏菌进行了形态、固氮酶活性和生理生化等方面进行了比较研究和探讨。

材料与 方法

(一) 供试菌株分离和来源

用根瘤切片培养法，对采自云南省的木麻黄 (*Casuarina equisetifolia*) 根瘤进行分离，在 BAP 培养基中培养，获得 K114 和 K105 纯培养物。

Ce24 菌株由中科院沈阳应用生态研究所张忠泽先生提供。S-65 由中国林业科学院亚热带

林业研究所提供。

(二) 培养基

1. BAP 培养基^[10]。
2. DPM 培养基^[13]。
3. BM+NZ 培养基：BAP 培养基中去掉 NH_4Cl 和丙酸钠，加酶解酪蛋白 (NZ AmineA) 5g/L。

以上均为 pH6.8, 0.6 kg/cm²，灭菌 30 分钟。

(三) 形态与培养特征

BAP 和 DPM 培养基中，分别定量接种，28℃ 静止培养 2 周，观察生长量和色素产生，同时制片显微镜观察。

(四) 细胞壁化学组份分析

采用 Hasegawa^[7] 和王平^[8] 等人方法。

(五) 固氮酶活性测定

用 DPM 培养基无氮诱导培养，注入 10% 乙炔气后，隔 24 小时取样，用上海 102G 型气相色谱仪测定乙烯产生量。菌体蛋白测定用 Jeffrey 等人方法^[9]。

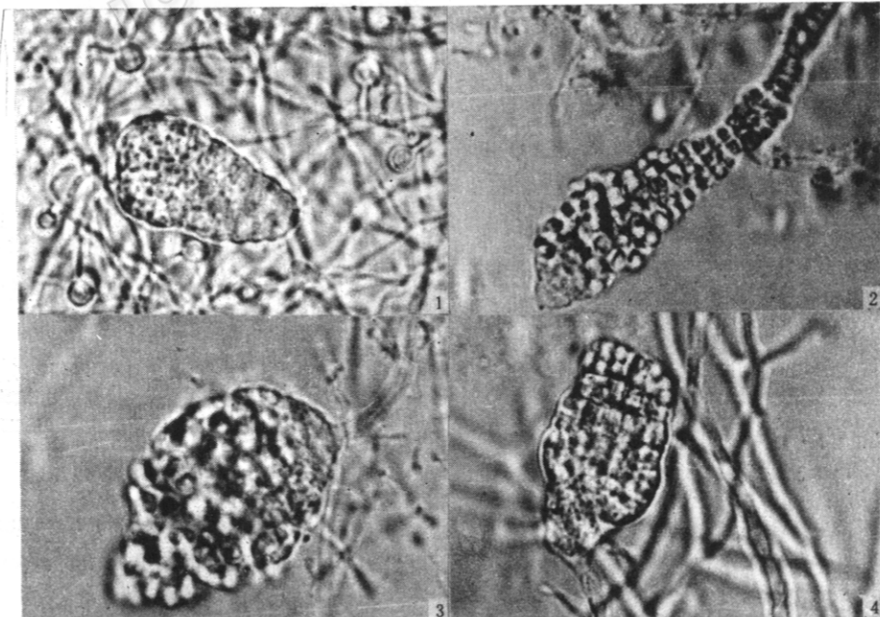


图 1 四株木麻黄根瘤分离菌的菌丝和孢囊形态照片 (BAP 培养基中培养 2 周)

1. S-65(X1000) 2. Ce24(X1000) 3. K114(X1000) 4. K105(X1000)

表 1 四株供试菌形态和培养特征的比较

培养基	BAP		DPM		
菌株	形态特征	生长	培养特征	生长	细胞色素
S-65	菌丝较细 (0.4 - 0.6 μ m) 孢囊多为草莓形。	++	较小颗粒团状	+	-
Ce24	菌丝粗细中等 (0.6 - 0.8 μ m) 孢囊多为棒状。	+++	絮团状	++	+
K114	菌丝粗细不均 (0.6 - 1.2 μ m) 孢囊多为圆锥形。	++	中等颗粒团状	++	-
K105	菌丝较粗 (0.9 - 1.4 μ m) 孢囊多为瓶状。	+++	较大颗粒团状	+	-

(六) 生理特性

BM+NZ 培养基中预培养做接种源。11 种供试糖和 6 种有机酸盐分别过滤灭菌后加入 BM 培养基中 (终浓度分别为 0.5% 和 0.2%)。取对数期接种源菌体, 洗涤、研磨、定量转接于各实验管中, 定期观察菌体生长量。每株菌重复 3 次。

结果与讨论

(一) 形态与培养特征

四株菌都具有典型的弗兰克氏菌特征: 具分枝、分隔菌丝, 孢囊形状多样 (图 1)。DPM 培养基中均形成球形孢囊, 其中 S-65, K105 在 DPM 培养基中生长较差, 孢囊形成较少。仅 Ce24 产生浅棕色不溶性色素。

表 1 结果表明: 四株菌在同一生长条件下, 菌丝形态、孢囊形状以及菌丝在液体培养基中聚集形成的团状颗粒均存在不同程度差异。

(二) 细胞壁化学组份

四株菌的全细胞氨基酸均含有二氨基庚二酸 (meso-DAP); 不含 LL-DAP。全细胞糖均含有木糖、半乳糖以及葡萄糖、甘露糖、核糖和鼠李糖; 不含阿拉伯糖, 故糖型均为 D 型。这与报道的大多数弗兰克氏菌糖型相同。

(三) 固氮酶活性

表 2 四株供试菌最大固氮酶活性 (nmol/L C₂H₄/mg 蛋白/h)

菌株	S-65	Ce24	K114	K105
活性	30.6	73.8	149.1	28.2

四株菌均具有不同程度固氮酶活性。

表 2 结果表明: S-65 和 K105 要明显低于 Ce24 和 K114 的最大固氮酶活性。另外, 从时程测定比较来看, S-65 的最大固氮酶活性出现在乙炔注入后 48 小时, 而 Ce24、K105 和 K114 则在乙炔注入后 72 小时表现出最大活性。其中, Ce24 和 K114 的活性下降迅速, 而 S-65 和 K105 的活性下降较为缓慢, 这表明四株菌在同一条件下的固氮能力有明显差异。另外, Murry 等曾报道, 孢囊数量与酶活性呈一定线性相关 [10]。因此, 四株菌在 DPM 培养基中的不同生长特性, 使孢囊的形成数量不等, 表现出不同的固氮酶活性 (图 2)。

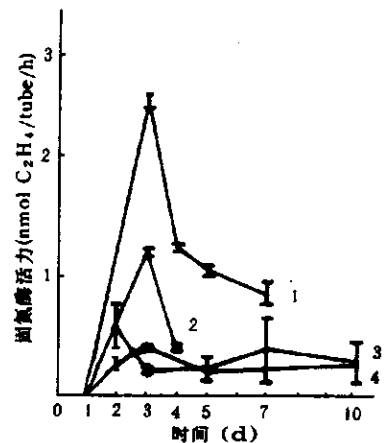


图 2 4 株菌固氮酶活性时程的比较

1. K114, 2. Ce24, 3. S-65, 4. K105

(四) 生理特性

四株菌均能不同程度地利用乙酸钠、丙酸钠和丙酮酸钠, 而对丁二酸钠、苄基酸钠和苯甲

酸钠均不能利用,其中以丙酸钠均利用较好(表3)。

对0.5%供试糖的利用上,S-65与其它三株菌存在显著差异:S-65能利用多种糖在0.5%碳源中生长。而Ce24、K114和K105对供试糖均不能利用,不能在0.5%碳源中生长。按照Lechvelier和Baker以及Lechvelier和阮继生对弗兰克氏菌的生理分型^[3,4],S-65应属于生理A型菌,其余三株菌则属于生理B型菌。

综上所述,由同一种木麻黄根瘤分离的四株弗兰克氏菌在形态与培养特征、固氮酶活性以及供试糖和有机酸盐的利用上各不相同,其中S-65与同一地域环境分离的Ce24和不同地域环境分离的K114、K105三株菌存在显著差异,表明同一种木麻黄寄主植物的根瘤中存在有差异的菌株。另外也表明,相同或不同地域环境分离菌并不带有受环境因素影响的迹象。

表3 四株供试菌碳源利用的比较

菌株	0.5% 糖											0.2% 有机酸盐						对照
	G1	F1	G2	R1	M1	M2	S1	R2	L	A1	MG	A2	P1	P2	S2	M3	B	
S-65	+	-	+	++	+	+	+	++	-	-	+	++	+++	+++	-	-	-	-
Ce24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	-	-	-	-
K114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+	-	-	-	-
K105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	++	-	-	-	-

+++：生长极好，++：生长较好，+：生长差，-：不生长，G1：葡萄糖，F1：果糖，G2：半乳糖，R1：鼠李糖，M1：甘露糖，M2：麦芽糖，S1：蔗糖，R2：棉子糖，L：乳糖，A1：阿拉伯糖，MG：α-甲基-D-葡萄糖，A2：乙酸钠，P1：丙酸钠，P2：丙酮酸钠，S2：丁二酸钠，M3：苹果酸钠，B：苯甲酸钠。

目前,对同种寄主分离菌存在差异的现象还没有一个圆满的解释。但Lechvelier等曾经从一株弗兰克氏菌R₄₃得到过一个突变株,它能在原菌株不能生长的以阿拉伯糖为碳源的培养基上生长,而且生长速度、色素类型和侵染性方面都有变化^[11]。甚至Burggraaf等认为弗兰克氏菌存在异质的菌丝体。他们将一株分离菌破碎、研磨后分别培养,得到了在生理、侵染性等方面不同的菌株^[12]。因此,对这一问题的研究还有待于更深入地进行。

参 考 文 献

1. 阮继生等:放线菌研究及应用,科学出版社,北京, p.473-474, 1990。

- 李忠伟,丁鉴:微生物学报, 26(4):295-301, 1986。
- Lechevalier M P et al.: *Can. J. Bot.*, 61:2826-2833, 1983.
- Lechevalier M P et al.: *Plant and Soil*, 78:15-22, 1984.
- Hafeez F et al.: *Plant and Soil*, 78:45-59, 1984.
- 袁长芳:微生物学报, 29(5):360-363, 1983。
- Hasegawa T et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29:319-322, 1983.
- 王平:微生物学报, 13(5):228-231, 1986。
- Jeffrey O et al.: *Physiol. Plantarum.*, 70:272-278, 1987.
- Murry M A et al.: *Plant and Soil*, 78:61-78, 1984.
- Lechevalier M P: In *The Actinomycetes*, p.131-162, 1985.
- Burggraaf A J P et al.: *Plant and Soil*, 78:29-41, 1984.
- Baker D: *Plant and Soil*, 78:23-28, 1984.

(1992-3-9收稿)