

# 弗兰克氏菌的分类研究进展

周志宏 石彦林 刘志恒

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

弗兰克氏菌是非豆科植物共生固氮菌。到目前为止,已发现它们可以分别与8个科、25个属的200多种非豆科植物共生<sup>[1]</sup>,其中包括赤杨、杨梅、沙棘、胡颓子、马桑、木麻黄、悬钩子、仙女木等。这些植物对于荒地的开垦和防止水土流失具有重要意义。而弗兰克氏菌与这些植物共生形成可以固氮的根瘤,在自然界的氮素循环中起重要作用。尽管弗兰克氏菌如此重要,但因为它在微生物领域中是个新成员,且因其生长缓慢,传统的分类方法对它不合适,所以弗兰克氏菌的分类仍处于十分混乱的阶段。目前世界上公认只有弗兰克氏菌属的存在,而没有确定的种名。这种状况严重阻碍了弗兰克氏菌的研究及其资源的开发。1970年Becking<sup>[2]</sup>正式定名弗兰克氏菌并根据宿主来源的不同将其分成10个种(尽管早在1886年Brunchorst为了纪念瑞士科学家A. B. Frank就已提出使用弗兰克氏菌的名称,但一直没有被采用)。1978年Callaham从香蕨木中分离出内生菌,随后越来越多的弗兰克氏菌被发现,Becking的寄主分类法已不能正确地确定新的弗兰克氏菌的分类情况。例如*Frankia alni*,按照Becking的分类法,只能感染赤杨,实际上它也能感染杨梅<sup>[3]</sup>,而且弗兰克氏菌生长缓慢的特点也限制了传统的表型性状分类法的应用。因此,分子生物学方法对于弗兰克氏菌,似乎更有效<sup>[4]</sup>。实际上,从方法学角度来说,弗兰克氏菌的分类研究可以说是微生物分类学的一个新的里程碑,因为弗兰克氏菌分类标准的解决会在方法上产生一个突破口,从而有助于生长缓慢的微生物分类难题的突破。本文的目的就是要分析弗兰克氏菌分类方法的现状与发展方向,更好地开发我国丰富的弗兰克氏菌资源。

## 1 属的鉴定

1.1 形态分类:形态特征是放线菌分类的一个重要指标,对于弗兰克氏菌也不例外。该菌的形态特征在

放线菌中是独特的<sup>[5,6]</sup>。在无氮培养基中菌丝有分枝(直径 $1\mu\text{m}$ 左右),无气丝,能形成纵横分隔的孢囊,孢囊多呈圆形、椭圆形或锥形。成熟的孢子由多层壁包裹着,孢子表面光滑,多呈圆形,不能运动。菌丝顶端还可形成直径为 $3\sim 5\mu\text{m}$ 大小的孢囊(固氮酶的位点)。以上特点都可作为弗兰克氏菌分类的参考依据。人们曾在放线菌结瘤植物的根瘤中发现孢囊<sup>[7,8]</sup>,因此根据此特征将能在根瘤中形成孢囊的弗兰克氏菌称作sp+,这种菌很难在体外生长;不能或极少在根瘤中形成孢囊的则称作sp-。但是sp+或sp-的特征是由于基因组成所造成的永久性的,还是由于环境因素引起的短暂可变的呢?因此,该特征是否有分类意义还有待进一步研究。

1.2 化学分类:近几年来,化学分类法在放线菌的分类中起着重要作用。这些化学指标主要包括细胞壁氨基酸类型,细胞膜中磷酸类脂和甲基萘醌类型,全细胞水解糖及脂肪酸类型的测定等<sup>[9-11]</sup>。

弗兰克氏菌的胞壁类型为III型。在不能回接的弗兰克氏菌中发现果糖,另外弗兰克氏菌普遍含有2-甲基-D-甘露糖<sup>[12,13]</sup>。因为其它放线菌不含有果糖和2-甲基-D-甘露糖,所以这二种糖可以作为该属的分类特征性糖。

通过分析弗兰克氏菌细胞内脂,发现不饱和脂肪酸大部分都已酰化成为甘油三酯<sup>[7]</sup>。这一特性是否是该属特征正在进行验证。

1989年Ander在检测弗兰克氏菌孢囊内的脂的分子量时,发现它们含有大量的具有26个碳原子的长链脂肪酸,这一点正被分类工作者所关注。弗兰克氏菌的磷酸类脂类型为PI。甲基萘醌主要含有MK-9(H4), MK-9(H6)和MK-9(H8)。

1.3 生理生化:据生理学研究表明,在弗兰克氏菌

1995-02-07 收稿

固氮的位置-泡囊,是通过建立含脂层来防护局部高压对固氮酶的损害。最近有人在弗兰克氏菌的细胞提取液中发现了大量的  $C_{35}H_{62}O_4$ 。如果能进一步得知它是弗兰克氏菌所固有的固氮位点防护层的脂,它就可以作为弗兰克氏菌属的重要标志之一。

弗兰克氏菌为好氧或兼性好氧微生物。它们一般在液体培养基中生长。因为具有固氮能力,所以可以在不含有机氮的培养基上生长。至今只发现少数不能固氮的弗兰克氏菌,所以固氮能力的有无也可作为鉴定弗兰克氏菌的标志之一。

1989年 Lechevalier 根据生长速度、糖利用及蛋白酶等生理生化特征将弗兰克氏菌分成二个亚群:A群和B群<sup>[7,14]</sup>(表1)。

表1 弗兰克氏菌A群和B群的生理生化特征

斜面	生长速度	生理生化	回接
A群生长	快	可以利用多种单糖和双糖产酸或不产酸;大多数产生水解酶,如:果胶酶、纤维素酶、淀粉酶和蛋白酶。	不能回接
B群不生长	慢	不能利用碳水化合物、蛋白质和淀粉,利用有机酸或吐温。	可以回接

1.4 杂交及序列分析法:分子生物学方法近年来广泛地应用于分类研究中,尤其是核糖体RNA基因可变区和保守区交替出现的结构使我们可以对不同远近亲缘关系的物种进行鉴别。筛选弗兰克氏菌特异性探针一直是人们努力的焦点。

1989年, Hahn 分别设计了弗兰克氏菌 EFP 和 IFP 的探针(大肠杆菌编号 16SrRNA1020 ~ 1040)<sup>[15]</sup>,发现它们能与弗兰克氏菌杂交,但不能与链霉菌属、轮丝链霉菌属、放线菌属、丙酸杆菌属、脓杆菌属、诺卡氏菌属、嗜皮菌属、地嗜皮菌属杂交。但遗憾的是无论 EFP 还是 IFP 的探针都能与白色诺卡氏菌杂交,且从赤杨中分离的 EFP 菌的探针不能与从其它植物中分离的 EFP 或 IFP 杂交。因此 Hahn 的探针只能在某些范围内使用。

1990年 Hahn 又采用了 16SrRNA180 ~ 240(以下

编号皆为大肠杆菌编号)的序列作为探针<sup>[16]</sup>,发现该探针可以与全部待测的 23 株弗兰克氏菌杂交;当与其它待测的 22 个属的放线菌进行杂交时,发现马杜拉放线菌属与小双孢菌属的反应呈阳性,也说明了该探针的局限性。此后, 140 ~ 220, 430 ~ 540, 980 ~ 1060 位置的相应探针不断地被合成研究,均没有获得完美的结果。

Simonet<sup>[17]</sup>为了解决特异性检测弗兰克氏菌的问题,设计了二对引物。一对是针对 9 个可以固氮的属来设计的;另一对是只特异性地扩增弗兰克氏菌属的 *nifH*-*nifD* 片段。当这二对引物同时被用于进行 PCR 扩增时,凡是具有二对引物的扩增产物基本上是弗兰克氏菌。有时某些地嗜皮菌呈阳性反应,为了排除地嗜皮菌的干扰,第三对扩增 16S-23S rRNA 基因间隔区的引物正在研究中。这个方法现在普遍被认为是最有希望的方法。

## 2 种的鉴定

从同一种植物中分离出的弗兰克氏菌,其形态、生理、生化、细胞壁及血清学特点都不尽相同。因此将同一植物中分离出的弗兰克氏菌认为是同一个种也是不科学的。因为弗兰克氏菌生长缓慢,许多传统的放线菌定种方法不能用于该菌的定种。目前世界上的弗兰克氏菌研究人员认为,在新的定种标准确定之前,所有的弗兰克氏菌都没有确定的种名。科学家们分别探讨了血清型、同功酶类型、全细胞糖、多肽类型、脂肪酸含量、限制性内切酶图谱、DNA-DNA 杂交等方法。这些方法都具有潜在的应用前景,但由于实验材料的缺少,还不能广泛地证明其可行性。Lalond 把从南美的鼠李目杨梅属和胡颓子属植物的根瘤中分离的弗兰克氏菌分别作了多肽图谱<sup>[18]</sup>、同功酶图谱<sup>[19]</sup>、固氮速度<sup>[20]</sup>及 *nif* 基因序列的测定<sup>[21]</sup>,发现寄主来源和弗兰克氏菌的不同有很大相关性。

DNA-DNA 同源性的测定近年来被认为是确定弗兰克氏菌种的最有前途的方法。Fernandez<sup>[22]</sup>采用此技术将从赤杨中分离出来的 14 株弗兰克氏菌分成 3 个基因种;将从胡颓子中分离的 12 株弗兰克氏菌分成 5 个基因种;从木麻黄中分离的 9 株弗兰克氏菌定为 1 个基因种。以后又测定不同弗兰克氏菌的 rRNA 基因启动子区域长约 274bp 的序列,发现 Fernandez 的 3 个赤杨基因种该区域序列也不同;但 3 个测试的胡颓

子基因种的序列却几乎是一致的。实验者推测,这是由于16S rRNA基因的高度保守所造成的种与种之间在该序列上难以区分。

Nazaret<sup>[23]</sup>采用PCR方法扩增16S rRNA基因921~1189位置的DNA片段,并进行序列分析,发现除有一个例外,其余的全部符合同一个基因种的弗兰克氏菌菌株其PCR图谱相同,从而表明,Fernandez的9个基因种的划分是科学的。她选择16S rRNA来作为鉴定弗兰克氏菌种的研究是有远见的。值得注意的是,Nazaret的进化树状谱表明,Fernandez从赤杨中分离出的1号基因种与从木麻黄分离出的9号基因种的亲缘关系比从赤杨中分离出的2号和3号基因种的关系近。

鉴于nifD-K基因间隔区较长且变化大,Jamann在nifD和nifK基因的保守区分别设计了引物<sup>[24]</sup>,由此扩增出的nifD-K基因间隔区并进行限制性内切酶处理,比较其酶切图谱来进行弗兰克氏菌的分种工作也不失为一种好方法。在使用此方法时,限制性内切酶的选择非常重要。当用HindI作酶切时,从胡颓子分离出的所有弗兰克氏菌的图谱都一样,而用MspI和ScaI作酶切时,结果与Fernandez和Nazaret的一样,即:(1)寄主来源是划分弗兰克氏菌种的一个重要依据,但不是最准确的依据。(2)从赤杨中分离出的1号基因种与从赤杨分离出的2号基因种和3号基因种的关系较远。

### 3 国内研究现状

中国科学院应用生态研究所根据形态特征、生理生化特性、细胞化学组分分析及回接等实验将他们分离的12株弗兰克氏菌分成3个不同类群。类群I包括从赤杨和杨梅中分离的弗兰克氏菌;类群II为从木麻黄中分离的弗兰克氏菌;类群III包括从胡颓子分离的弗兰克氏菌。

中国科学院微生物研究所放线菌组从西双版纳的4个属7个种的植物中分离到70株弗兰克氏菌,并对其中的17株用形态学、生理学、细胞壁组成(糖型与DAP),甲基萘醌组成、固氮能力等方法进行了详细的研究<sup>[25]</sup>,发现这17株都有典型的弗兰克氏菌孢囊结构,糖型皆为D型,含有meso-DAP,并用比较DNA-DNA同源性的方法将7株弗兰克氏菌分成了3群。目前正在进行16S-23S rRNA基因间隔区的研

究工作,以期在种的鉴定方面有所突破<sup>[27]</sup>。

### 4 小结

(1)从系统发育角度来看,弗兰克氏菌应放在放线菌目中,固氮能力不能作为弗兰克氏菌属的特征性分属标准,只能作为参考依据,因为某些弗兰克氏菌也没有固氮能力。

(2)弗兰克氏菌定属主要通过形态学、细胞化学、与植物的共生能力、固氮酶产物等多项指标进行综合考虑。

(3)近期的工作有希望筛选到弗兰克氏菌属特异性探针以及弗兰克氏菌固氮酶特异性探针。

(4)弗兰克氏菌区分种的工作目前停留在寄主来源上。但DNA-DNA杂交、LFRFA分析、16S rRNA高变区探针、特异性蛋白质图谱及rrn和nif基因<sup>[28]</sup>序列分析方法都有希望使弗兰克氏菌的定种工作提高到一个新水平。

### 参 考 文 献

- [1] Schwintzer C R, J D Tjepkema. The Biology of Frankia and Plants. Academic Press, San Diego, Calif. 1990, 1~3.
- [2] Becking J H. Int J Syst Bacteriol, 1970, 20: 201~220.
- [3] Baker D D. Physiol Plant, 1987, 70: 245~248.
- [4] Lechevalier M P. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44: 1~8.
- [5] Schwintzer C R, Tjepkema J D. The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants. Academic Press, San Diego, Calif. 1990, 4~5.
- [6] 阮继生,刘志恒,梁丽樵等.放线菌研究及应用,北京:科学出版社,1990,454~457.
- [7] Lechevalier M P, Baker D, Horriere F. Can J Bot, 1983, 61: 2826~2833.
- [8] Normand P, Lalonde M. Can J Microbiol, 1982, 28: 1133~1142.
- [9] Schwintzer C R, Tjepkema J D. The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants. Academic Press, San Diego, Calif. 1990, 37~39.
- [10] 阮继生,刘志恒,梁丽樵等.放线菌研究及应用.北京:科学出版社,1990,80~138.
- [11] Dietz A, Thayer D W. Actinomycete Taxonomy. Society for Industrial Microbiology, Arlington, Va. 1980, 227~291.
- [12] Mort A, Normand P, Lalonde M. Can J Microbiol, 1983, 29: 993~1002.
- [13] St-Laurent L, Bousquet J, Simon L, et al. Can J Microbiol, 1987, 33: 764~772.
- [14] Lechevalier M P, Lechevalier H A. Bergey's manual

- of systematic bacteriology, vol. 4. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 1989, 2410 ~ 2417.
- [15] Hahn D, Dorsch M, Stackebrandt E, *et al.* Plant Soil, 1989, 118: 218 ~ 219.
- [16] Hahn D, Kester R, Starrenburg M J C, *et al.* Arch Microbiol, 1990, 154: 329 ~ 335.
- [17] Simonet P, Grosjean M C, Misra A K, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 3278 ~ 3286.
- [18] Gardes M, Lalonde M. Physiol Plant, 1987, 70: 237 ~ 244.
- [19] Gardes M, Bousquet J, Lalonde M. Appl Environ Microbiol, 1987, 53: 1596 ~ 1963.
- [20] Nesme X, Normand P, Tremblay F M, *et al.* Can J Bot, 1985, 63: 1292 ~ 1295.
- [21] Normand P, Simonet P, Bardin R. Mol Gen Genet, 1988, 213: 238 ~ 246.
- [22] Fernandez M P, Meugnier H, Grimont P A D, *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1989, 39: 424 ~ 429.
- [23] Nazaret S, Cournoyer B, Normand P, *et al.* J Bacteriol, 1991, 173: 4072 ~ 4078.
- [24] Jamann S, Fernandez M P, Normand P. Mol Ecol, 1993, 2: 17 ~ 26.
- [25] Beyazova M, Lechevalier M P. Int J Syst Bacteriol, 1992, 42: 422 ~ 433.
- [26] Shi Y L, Ruan J S. Research on Multipurpose Tree Species in Asia. Winrock International Institute for Agriculture Development. 1990, 207 ~ 215.
- [27] 周志宏, 阮继生, 刘志恒等. 微生物学报, 1996, 26(2): 155 ~ 157.
- [28] Simonet P, Normand P, Moiroud A, *et al.* Arch Microbiol, 1990, 153: 235 ~ 240.