

DNA 碱基组分分析在 *Frankia* 属分类中的应用研究

袁长芳 周鸿宾

(山西省生物研究所, 太原)

孙耀来 刘瑞祥* 武玉珍*

(山西大学生物系, 太原)

摘要 用热变性温度法, 测定了非豆科植物固氮放线菌 *Frankia* 属七个菌株的 DNA 碱基组成, 结果表明, 该属的 DNA(G + C)mol% 在 66.0—72.0 之间。这些菌株可分为两个不同的类群, I 群包括 EmI108, EmI131, EgI413 和 CeI513, (G + C)mol% 66.12—67.34 之间; II 群包括 AsI13 和 MrIr5, (G + C)mol% 69.78—72.22 之间。各菌株的生理试验表明, I 群菌株多利用葡萄糖或吐温作为唯一碳源; II 群菌株则不利用葡萄糖和吐温, 所有菌株都利用丙酸和醋酸。

关键词 *Frankia*; DNA(G + C)mol%

从遗传物质基础 DNA 组成的差异, 确定细菌的分类学关系, 最先采用的方法是 DNA×(G + C)mol%, 这是 60 年代初发展起来的分类学新技术, 目前已广泛应用于微生物分类中。每一个生物种都有其特定的 DNA(G + C)mol%, 而且, 对每一个生物种来说数值是稳定的, 它不受菌龄和培养条件等各种外界因素的影响。据经验, 一个种内各菌株间的 (G + C)mol% 不应相差 4—5% 以上, 同一属内各菌株间不应相差 10% 以上。

非豆科植物根瘤内生菌的分类学研究, 是从 1978 年 Callahan 等人^[1]从杨梅科香蕨木根瘤中分离得到第一株纯培养开始的。限于多种原因, *Frankia* 属分类尚在起步^[2]。本实验利用从 4 科 4 属非豆科植物根瘤中分离的 *Frankia* 菌株, 通过热变性法测定其 DNA(G + C)mol% 及碳源利用生理研究, 初步探讨了内生菌株间的亲缘关系, 结果报道如下。

材料和方法

(一) 菌株及其来源

试验中所用菌株概况列入表 1。

(二) 菌株培养与培养基配制

1. 大肠杆菌, 阴沟肠杆菌与根瘤土壤农杆菌的培养: 以肉汤培养液, 30℃, 摇床振荡培养 24 小时, 离心收集菌体。

2. *Frankia* 内生菌株的培养: EmI108, EmI131, EaI827 和 EgI413 用 TB^[3] 培养基培养。AsI13, MrIr5 和 CeI513 菌株用丙酸培养基 (PAM)^[4]。保存菌种接种于盛有 100ml 培养液的 500 ml 容积三角瓶中, 30℃ 静止培养 14 天, 离心收集菌丝体。

不同 *Frankia* 菌株碳源利用比较, 用基础培养液^[5], 氮源加 NH_4Cl 0.2g/L, 碳源按表中

* 刘瑞祥、武玉珍系山西大学生物系 87 届毕业生。

表1 试验所用菌株概况

菌 株	寄主植物	菌株来源
大肠杆菌 (<i>E. coli</i> K12)		山西大学生物系
阴沟肠杆菌 (<i>E. cloacae</i>)		山西省生物研究所 固氮遗传组保藏
根瘤土壤农杆菌 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Com.)		固氮遗传组保藏
<i>Frankia</i> sp. As113	辽东桤木 (<i>Alnus sibirica</i>)	固氮遗传组保藏
<i>Frankia</i> sp. Mr1r5	红杨梅 (<i>Myrica rubra</i>)	固氮遗传组保藏
<i>Frankia</i> sp. Em1108	翅果油树 (<i>Elaeagnus mollis</i>)	固氮遗传组保藏
<i>Frankia</i> sp. Em1131	翅果油树 (<i>Elaeagnus mollis</i>)	固氮遗传组保藏
<i>Frankia</i> sp. Eg1413	蔓胡颓子 (<i>E. glabra</i>)	固氮遗传组保藏
<i>Frankia</i> sp. Ea1827	沙枣 (<i>R. angustifolia</i>)	固氮遗传组保藏
<i>Frankia</i> sp. Ce1513	木麻黄 (<i>Casuarina equisetifolia</i>)	固氮遗传组保藏

测定结果

利用林万明等人的方法,将已提取的10个菌株 DNA 碱基组分进行了分析,每个样品试验3次,取平均值。DNA 的 (G + C)mol% 列入表2。文献值系伯杰氏手册中的数值^[5]。

表2 10个菌株的 DNA(G + C)mol%

菌 株	(G + C)mol%	
	测定值	文献值
<i>E. coli</i> K12	50.59	50—51
<i>E. cloacae</i>	55.1	52—59
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	60.02	59.6—62.8
<i>Frankia</i> sp. As113	72.22	无文献值
<i>Frankia</i> sp. Mr1r5	69.78	无文献值
<i>Frankia</i> sp. Em1108	67.34	无文献值
<i>Frankia</i> sp. Em1131	66.12	无文献值
<i>Frankia</i> sp. Eg1413	66.37	无文献值
<i>Frankia</i> sp. Ea1827	56.36	无文献值
<i>Frankia</i> sp. Ce1513	66.37	无文献值

要求加入,培养14天,以 Lowry 方法^[6]测定菌体蛋白。

(三) DNA 的提取与其碱基组分测定

DNA 的提取程序基本按 Marmur 法^[7]进行。将供试菌体(湿重)2—3g,分别用溶菌酶或超声波破壁,以下处理同 Marmur 法程序。

DNA(G + C)mol% 的测定基本参照林万明等人的方法^[8]进行,紫外分光光度计,超恒温水浴等均系国产。

结果与讨论

(一) 供试菌株 DNA(G + C)mol% 的

表2表明,本试验用的仪器装置所测得的大肠杆菌,阴沟肠杆菌及根瘤土壤农杆菌的 DNA(G + C)mol% 数值基本与伯杰氏手册提供的数值相一致,说明仪器装置符合技术要求。*Frankia* 各菌株,无文献值可查。从本试验所得数值来看,各菌株间有明显的差异。

(二) *Frankia* 菌株对不同碳源的利用

在含有不同碳源的基础培养基中,接种、培养及试验同文献[5],培养14天,菌株生长情况以菌体蛋白量表示出来(见表3)。

表3表明,Em1108, Em1131, Eg1413, Ea1827 及 Ce1513 五个菌株对葡萄糖或吐温

表3 *Frankia* 菌株对不同碳源利用的比较

菌株	菌体蛋白 μg/15ml	碳源							不加碳源 CK
		葡萄糖 10g/L	蔗糖 10g/L	醋酸钠 1g/L	丙酮酸 1g/L	琥珀酸 1g/L	丙酸 0.5g/L	吐温80 2g/L	
As113		18.67	13.00	—	23.33	8.47	215.6	30.33	12.70
Mr1r5		9.51	50.00	30.00	8.55	9.00	78.00	9.87	6.54
Em1108		218.0	7.33	38.00	10.52	10.00	165.3	52.67	7.54
Em1131		200.6	37.33	16.67	19.05	12.33	30.00	20.00	8.52
Eg1413		356.8	45.73	326.6	69.33	87.87	321.8	158.6	18.67
Ea1827		71.00	90.47	14.20	10.10	152.6	118.7	64.67	6.67
Ce1513		52.00	93.07	19.33	12.10	151.3	230.0	65.33	17.60

80 的利用较好, 而 AsI 13 及 MrIr 5 则几乎不利用葡萄糖和吐温 80, 所有菌株对丙酸的利用都较好。

(三) 讨论

从表 2 的结果看, 可以把 *Frankia* 菌株 DNA(G + C)mol% 数值分成两个不同群, I 群包括: EmI 108, EmI 131, EgI 413 及 CeI 513 四个菌株, (G + C)mol% 数值在 66.12—67.34 之间; II 群包括: AsI 13 和 MrIr 5 两个菌株, 数值在 69.78—72.22 之间。表 3 的试验结果又与表 2 的差异性一致, 即 I 群菌株多数能利用葡萄糖和吐温 80, II 群则不能利用。这种一致性, 说明遗传特性和生理性状的一致性。Eal827 菌株从生理特性上看是属于 I 群的菌株, 但其 DNA(G + C)mol% 数值低于 I、II 群, 为 56.36%, 差异很明显, 是否是试验误差, 经重复测试三次, 结果分别为 55.90, 56.34 及 56.74, 数

据较为一致, 则可排除试验误差, 说明其 DNA 碱基组成有其特殊性。由于我们所试验菌株数量有限, 所测生理生化指标尚少, 对于 *Frankia* 属的分类难以作出结论, 欲下定论, 还待掌握大量菌株后进行更深入研究。

参 考 文 献

- [1] Callaham, D. et al.: *Science*, 199: 899—902, 1978.
- [2] Lechevalier, M. P.: *Plant and Soil*, 78: 1—6, 1984.
- [3] Burggraaf, A. J. P. et al.: *Plant and Soil*, 61: 157—168, 1981.
- [4] Shipton, W. A. and A. J. P. Burggraaf: *Plant and Soil*, 69: 149—161, 1982.
- [5] 袁长芳: *微生物学报*, 27(1): 64—68, 1987.
- [6] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275, 1951.
- [7] Marmur, J.: *Mol. Biol.*, 3: 208, 1961.
- [8] 林万明等: *微生物学通报*, 8(5): 215—216, 1981.
- [9] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 261—293, 1974.