

(4)保持适宜的土壤含水量。水分适宜,作物生长健壮,根系吸收养分的能力增强;水分适宜,磷的扩散系数大大增加,对作物吸收有利。因此,在农业生产中,有效地调节土壤的水分状况对提高土壤磷的有效性和植物的磷素营养水平是十分必要的。

3 结语

测定安徽省几种主要土壤的无机磷含量,可以发现:除石灰性黄潮土和砂姜黑土有 $\text{Ca}_{10}-\text{P}$ 的积累、粘盘黄棕壤发育的水稻土有 $\text{O}-\text{P}$ 的释放外,各种土壤无机磷积累的总的特点是 Ca_2-P 积累少, Ca_8-P 、 $\text{Al}-\text{P}$ 、 $\text{Fe}-\text{P}$ 的积累较多。在农业生产上可采用选择种植适宜的作物种类,调节土壤 pH, 增施有机肥料,调节土壤的水分状况等措施,调节土壤无机磷的活性,为作物生长提供充足的磷素营养,达到作物高产、优质的目的。

参 考 文 献

- 1 蒋柏藩,顾益初.石灰性土壤无机磷分级体系的研究.中国农业科学,1989,22(3):58-66
- 2 顾益初,蒋柏藩.石灰性土壤无机磷分级的测定方法.土壤,1990,22(2):101-102
- 3 蒋柏藩.石灰性土壤无机磷有效性的研究.土壤,1993,25(1):61-64
- 4 成瑞喜,刘景福,徐芳森.磷肥对中性土壤无机磷形态转化及其有效性的影响.土壤,1996,28(2):225-228
- 5 何念祖,孟锡福.植物营养原理.上海科技出版社,1987,137-146

(上接第 160 页)

参 考 文 献

- 1 Lechevalier MP. Int. J. Syst., Bacteriol., 1994, 44:1-8
- 2 Benson D R, Silvester WB, Microbiol Rev., 1993, 57:293-319
- 3 Callahan D, DelTredici P Torrey JG. Science, 1978, 199:899-902
- 4 Mirza MS, Hahn D, Akkermans ADL. Syst. Appl. Microbiol., 1992, 15:293-295
- 5 Lechevalier MP, Baker D, Horriere F. Can. J. Bot., 1983, 61:2826-2833
- 6 胡传炯,周平贞,周启.马桑菌株生物学特征.微生物学报,1996,36(2):132-132
- 7 王平.微生物学通报,1986,13:229-231
- 8 Bousfield IJ. Simple rapid methods of cell wall analysis as an aid in the identification of Aerobic Coryneform Bacteria, In: chemical methods in bacterial systematics, M Goodfellow and Minilkin D.E. (eds). Academic Press, London, 1985, 157-168
- 9 梁善芳,袁德军,夏涛等.放线菌细胞壁化学组分分析方法的研究.微生物学通报,1991,17(4):247-249
- 10 Benson DR, Hanna D. Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47:489-494
- 11 Gardes M, Lalonde M. Physiol. Plant., 1987, 70:237-244
- 12 张龙翔.生物化学实验方法和技术.高教出版社,1983,413
- 13 Simonet P, Capellano A, Navarro E, et al., can. J. Microbiol., 1984, 30:1292-1295
- 14 Maniatis T. et al., Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982, 465-478

158-160, 155

S182

Q939.139

马桑弗兰克氏菌的生物学特性的多样性

胡传炯 周 启

周平贞[✓]

(华中农业大学生命科技学院 武汉 430070)

(中国农科院油料作物研究所)

摘 要 报道了分离自我国尼泊尔马桑根瘤的 20 株内生放线菌的系统的生物学特性。这些菌株在形态上具弗兰克氏菌属的典型特性,即丝状菌丝体上有孢囊和泡囊。少数菌株还有串珠状生殖菌丝。但它们在培养特征、生理特性、细胞化学组分、拮抗性、细胞可溶性蛋白和脂酶同工酶电泳图谱、质粒类型和限制酶切图谱彼此均有较大差异,几乎没有两个菌株在所有检测指标的结果上是相似的。表明马桑弗兰克氏菌在生物学特性上有明显的多样性。

关键词 马桑; 弗兰克氏菌; 多样性

固氮放线菌 生物学特性

弗兰克氏菌(*Frankia*)是能与 8 科 25 属 200 多种非豆科双子叶植物共生结瘤的固氮放线菌^[1,2]。自从 1978 年 callahan 等从香蕨木(*Comptonia peregrina*)根瘤中分离获得第一株纯培养以来^[3],已从赤杨属(*Alnus*),胡颓子科(*Elaeagnaceae*),木麻黄科(*Casuarinaceae*),杨梅科(*Myricaceae*)中 9 属植物根瘤中分离到几百株弗兰克氏菌纯培养。但是包括马桑属(*Coriaria*)在内尚有 4 科 16 属植物根瘤中没有分离到纯培养,或者即使分离到纯培养也不能成功回接^[2]。

弗兰克氏菌与马桑共生关系的研究远远落后于与其它放线菌结瘤植物的共生关系。主要原因是长期以来没有获得能够成功回接的内生菌纯培养。我国学者周平贞等自 80 年代初就陆续从广泛分布于我国的尼泊尔马桑(*Coriaria nepalensis*)根瘤中分离获得大量内生菌纯培养,并对它们的回接进行了成功的探索,积累了许多宝贵经验。在国外 1992 年才报道从尼泊尔马桑根瘤中分离到放线菌纯培养,并采用 16srRNA 作分子标记的 *Frankia* 属特异性探针进行鉴定,然而这一纯培养不具有典型的 *Frankia* 形态特征,也不能成功回接^[4]。

本试验主要是将周平贞等分离得到的 200 多株马桑根瘤内生菌纯培养物,经初步回接和形态观察后从中选出 20 余株具有典型的 *Frankia* 形态和培养特征的纯培养(包括回接成功和回接没有成功的菌株)作为试验材料,首次进行系统的生物学特性研究,以累积有关弗兰克氏菌纯培养的系统资料,分析与其它弗兰克氏菌的异同;同时也可以为目前国际上尚未解决的弗兰克氏菌的进一步分群或分种找出一些有益的指征做一点贡献。

下面概要报道这些实验结果。

1 材料与方法

- (1) 试验菌株 Cs013, Cs025 等 20 株放线菌纯培养均分离自我国尼泊尔马桑。
- (2) 培养特征、生理类型、碳氮源利用试验均按文献^[5]的方法。
- (3) 抗菌活性测定:滤纸片法^[6]。

(4)细胞化学组分测定:按文献[7]测定全细胞糖型;胞壁氨基酸组分的薄层层析和氨基酸自动分析测定方法见文献[8,9]。

(5)可溶性蛋白和酯酶同功酶聚丙烯酰胺凝胶电泳:按 Benson 等^[10]方法制备可溶性蛋白;Gardes^[11]等方法制备酯酶同功酶样品;以标准方法制备不连续聚丙烯酰胺凝胶^[12];以岛津双波长扫描仪来估算各菌株电泳谱带异同。

(6)质粒快检:参照文献[13]描述的方法并改进^①。

(7)限制酶切图谱:用酶解法提总 DNA;标准酶切后^[14],用扫描仪分析各酶切图谱。

2 结果

2.1 培养特征

所有检测菌株均能在液体培养基和固体培养基上生长。在同一种液体培养基中不同菌株的生长速度,生长状态,菌丝体颜色和可溶性色素等性状都有不同程度的差别;在固体培养基上不同菌株的生长速度明显不同,生长快的菌株在接种后1周内就出现菌落;有些菌株还在不同时间内如2、4和8周之内陆续出现菌落。所有菌落不产生气生菌丝,大多数菌株的基内菌丝发育良好,但不同菌株在菌落的表面性状,颜色和可溶性色素均有一定差异。根据菌落的这些性状可将20株马桑菌株的菌落分成四种类型。

2.2 生理类型

Lechevalier (1983)根据能否利用 Tween-80 将弗兰克氏菌分为两个生理类型^[5],即生理 A 型和生理 B 型。生理 A 型是在无 Tween-80 的培养液中能有效地利用葡萄糖,生长良好;在有 Tween-80 时,生长则受到抑制。生理 B 型恰恰相反,在无 Tween-80 的培养液中不能利用葡萄糖,生长微量;当有 Tween-80 时能促进葡萄糖的利用而生长量多。

我们的试验表明,参试的20株马桑菌株中有10株是属于生理 A 型的,有6株属于生理 B 型。尚有4株在有或没有 Tween-80 的条件下均能很好利用葡萄糖,而且在两种情况下的菌丝体都达到相同的最大生长量,表明这些菌株同时包含有 A 型和 B 型的特性。因此,将它们称之为 A/B 混合型。

2.3 碳、氮源利用

碳源利用试验表明,绝大多数菌都能良好利用0.2%的乙酸钠,丙酸钠和丙酮酸钠,只有极少数菌株能利用琥珀酸钠和柠檬酸钠;所有菌株不能利用苯甲酸钠作为唯一碳源。对于供试的7种糖和甘油的利用情况更加复杂,大多数菌株能利用1—4种单糖;有的菌株在利用某些糖时能够产酸。几乎全部参试菌株都不利用阿拉伯糖和甘油。

氮源利用试验表明,马桑菌株能良好利用 NH_4Cl 而几乎不利用 KNO_3 作为唯一氮源。而对于谷氨酸、甘氨酸及酪蛋白水解物的利用表现不同程度的差异。

马桑菌株碳、氮源利用上的差异反映了 *Frankia* 多样性的特点。

2.4 拮抗性

采用5种指示菌,对培养2—4周的马桑菌株培养滤液以纸片法分别进行活性测定表明,

① 胡传炳,博士学位论文,华中农业大学,武汉,1995。

在 20 株菌株中有 7 株没有抗菌活性,有 13 株有活性。在有活性的菌株中,除对大肠和白色假丝酵母均无活性外,有的对枯草杆菌、藤黄八叠球菌有作用;有的只对藤黄八叠球菌或只对红酵母等有活性。

2.5 细胞化学组分

经薄层层析(TLC)和氨基酸分析仪检测,20 株马桑菌株的细胞壁氨基酸组分有属 II 型(含 meso-DAP 和甘氨酸)的,也有属 III 型(含 meso-DAP)的。不同菌株在全细胞中含有的鉴别性糖变化很大。检测的 20 株马桑菌株根据鉴别性糖的组合可以分为六种糖型(分别是半乳糖、木糖和阿拉伯糖的不同组合),其中有的糖型在其它弗兰克氏菌中均未报道过^[1,5]。

2.6 细胞可溶性蛋白和酯酶同功酶聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

在细胞可溶性蛋白电泳后,20 株马桑菌株均能检测到 Rf 值为 0.57 的蛋白带,此外,Rf 值为 0.30、0.47 和 0.61 的蛋白带在大部分菌株中也被检出。通过比较各菌株间主要蛋白谱带类型的差异,可将 20 株菌株划分为 2 个蛋白电泳类群(PEG A 和 B)和 6 个亚群(PEG A₁、A₂ 和 B₁—B₄)。其中 B 群菌株占试验菌株的 75%。在每个亚群中绝大多数菌株的蛋白图谱具有很高的相似性,仅有极少数菌株的蛋白图谱与同一亚群的其它菌株有一些差别。酯酶同功酶的分析表明,来自同一蛋白电泳类群的菌株,可划归于相同的酯酶同功酶类群(EIG A, B)。但在蛋白电泳亚群水平上,两者有明显差异,即同一蛋白电泳亚群的菌株其酯酶同功酶谱带有一定差异。

2.7 质粒

采用质粒快检法在 21 株马桑菌株中检测到有 5 株携带有质粒。其中有 1 个菌株含有 2 个质粒,其它 4 个菌株各含有 1 个。质粒的大小约为 13—20kb。根据质粒数目和大小的差异,将 21 株马桑菌株划分为 4 个不同的质粒类群,即 PG I—IV。

2.8 限制酶切图谱

采用限制性内切酶 BamHI 分别对 15 株马桑菌株的总 DNA 进行酶切。并根据每一个菌株的 BamHI 酶切图谱,将相同或相近类型的菌株划分在同一个限制酶切类群(RPG)中,结果可以将 15 株马桑菌株分为 8 个类群(RPG A—H)。

3 小结

综上所述,通过 20 株马桑菌株的系统研究表明,不论它们是否回接成功,它们的菌体形态均具有弗兰克氏菌属的特征,如菌丝体呈放线菌样,有孢囊或泡囊,有的还有串珠状结构的菌丝段等。但是检测的这些菌株虽然都是从同一寄主植物马桑根瘤中分离获得,而它们的培养特征、生理特性、细胞化学组份、拮抗性、细胞可溶性蛋白和酯酶同功酶电泳图谱以及各种遗传特性等却彼此都有一定的差异。甚至在这 20 株菌株中几乎没有两个以上的菌株在所有检测指标的结果是相似的。表明马桑弗兰克氏菌在生物学特性上有显明的多样性。

致谢 作者感谢丁莹、阮继生先生惠赠 Frankia 参比菌株;梁蓉芳先生指导胞壁组分分析。

(下转第 155 页)