

紫云英根瘤菌的诱变*

曹燕珍 李阜棣

(华中农学院, 武汉)

根瘤菌的感染性是形成有效共生关系的一个重要性状。获得感染性强, 即主要是形成有效根瘤早的菌株, 是根瘤菌育种工作的一个重要方面^[1-3]。我们探索了⁶⁰Co- γ 射线和亚硝基胍(N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍, 简称NTG)对紫云英根瘤菌感染性的影响, 本文是初步实验结果。

材料和方法

一、出发菌株

实验用菌株为紫云英根瘤菌(*Rhizobium astragali*) A21, 是我们从紫云英根瘤中分离的有效菌株。

二、诱变因素

⁶⁰Co- γ 射线、NTG。

三、培养基

根瘤菌培养基: 蔗糖 10 克, 磷酸氢二钾 0.5 克, 硫酸镁 0.2 克, 氯化钠 0.1 克, 碳酸钙 3.0 克, 酵母(10%) 100 毫升, 微量元素液(硼酸 5 克, 钼酸钠 5 克, 蒸馏水 1000 毫升) 4 毫升, 琼脂 20 克, 水 896 毫升。pH 7.0。121℃ 灭菌 30 分钟。

结瘤试验用无氮培养基: 硫酸钾 0.9 克, 磷酸二氢钾 0.5 克, 磷酸氢钙 0.5 克, 硫酸镁 0.5 克, 氯化钠 0.5 克, 三氯化铁 0.02 克, 硼酸 0.02 克, 钼酸钠 0.02 克, 硫酸锰 0.02 克, 琼脂 10 克, 水 1000 毫升。pH 7.0。121℃ 灭菌 30 分钟。

四、处理方法

1. 用 pH 6.0 的无菌磷酸缓冲液从斜面上洗下根瘤菌, 在有玻璃珠的三角瓶中振荡使细胞

分散。调节菌悬液浓度到 5 亿/毫升左右。

2. ⁶⁰Co- γ 射线诱变: 钴源剂量率为 190 伦琴/分。根据剂量率和钴源距离计算出不同剂量所需的处理时间。菌液处理后立即进行平板培养。

3. NTG 诱变: 主要参考 Adelberg 等的方法^[4]。用 pH 6.0 的磷酸缓冲液配制浓度为 2 毫克/毫升的 NTG 溶液。处理时将菌悬液与 NTG 溶液混合, 使 NTG 浓度分别为每毫升 10、100、500 和 1000 微克。28℃ 下处理 30 分钟。

五、筛选方法

将不同剂量 ⁶⁰Co- γ 射线和 NTG 处理过的菌悬液, 经平板培养后, 随机挑取 100 个菌落分别移植到斜面培养基上。按常规琼脂斜面结瘤法进行筛选。把表面灭菌的紫云英种子置于温室中催芽, 挑选发芽势好而整齐的种子播在结瘤试验无氮培养基上。在灯光栽培室中(每日 16 小时光照) 20—25℃ 下培养。待子叶张开后, 用待测菌株的菌悬液接种, 继续培养。同时用出发菌株和出发菌株的子代做对比。逐日定时进行观察。根据现瘤时间和结瘤部位来比较各个菌株的感染力, 根据根瘤的颜色来判断其有效性。

结 果

一、⁶⁰Co- γ 射线处理结果

(一) 不同剂量 γ -射线对紫云英根瘤菌的致死作用

用不同剂量进行了数次测定。表 1 是一次试验结果。处理前各个处理的菌数均为 $2.5 \times$

* 本文中根瘤菌的 ⁶⁰Co 辐射处理试验由湖北省农业科学院提供钴源。

表1 紫云英根瘤菌在不同⁶⁰Co-γ射线处理剂量下的致死率

剂 量 (万伦琴)	存活菌数 (个/毫升)	致 死 率 (%)
0	2.5×10 ⁵	0
1.12	12.6×10 ⁵	95.0
2.81	17.7×10 ³	99.93
5.60	89.0	99.99
8.41	0.3	100
11.21	0	100
17.82	0	100

10⁵/毫升。从表中可看出,剂量超过8.41万伦琴时,致死率为100%。

(二) 不同剂量γ-射线对紫云英根瘤菌感染力的影响

每个处理取100个菌株进行结瘤试验,同出发菌株比较出现有效根瘤的时间。在本试验中,出发菌株现瘤时间为9天。比较结果见表2。从表2中可看出,γ-射线的剂量从0.11万伦琴到2.81万伦琴之间,对紫云英根瘤菌感染力的影响没有什么规律性;当剂量达到5.6万伦琴时,只有负变效果,这时所有菌株均延迟结瘤。

表2 ⁶⁰Co-γ射线不同剂量对紫云英根瘤菌感染力的影响

处理剂量 (万伦琴)	测 定 菌株数	处理菌株与出发菌株比较			
		提前现瘤 菌株数	同时现瘤 菌株数	推迟现瘤 菌株数	未现瘤菌 株 数
0(出发菌株)	1				
0(出发菌株子代)	100	8	10	34	48
0.11	100	2	4	28	66
0.56	100	1	1	35	63
1.12	100	1	4	51	44
2.81	100	4	9	20	67
5.60	50	0	0	9	41

二、NTG处理结果

(一) 不同浓度NTG处理对紫云英根瘤菌的致死作用

用不同浓度NTG处理后测定存活率,表明当NTG浓度为10、100、500、1000微克/毫升时,其致死率为11%、15%、37%和65%。

(二) 不同浓度NTG处理对紫云英根瘤菌感染力的影响

1. 本实验选用三种不同浓度的NTG,每项处理选取100个菌株,对紫云英根瘤菌感染力的影响(见表3)。从表3可看出,高浓度的NTG对紫云英根瘤菌有一定正变效应。

表3 不同浓度NTG处理对紫云英根瘤菌感染力的影响*

NTG 浓度 (微克/毫升)	结瘤频率 (%)
0 (出发菌株子代)	2
100	0
500	3
1000	6

* 本次实验中出发菌株的子代结瘤频率很低,可能是当时培养温度偏高(栽培室温度达25—28℃)。根据多次观察,温度超过25℃时结瘤不正常。但也不排除菌株本身有严重分离现象。

如果进一步观察不同处理下各菌株的现瘤时间,则可以看出高浓度NTG有明显的正变效果(表4)。

表4 各结瘤菌株的现瘤时间

NTG 浓度 (微克/毫升)	菌 株 号	现瘤时间 (天)
0 (出发菌株子代)	0—25	10
	0—28	10
500	500—20	7
	500—34	6
	500—45	8
1000	1000—17	6.5
	1000—27	8.5
	1000—35	7
	1000—57	10
	1000—62	7
	1000—75	9.5

2. 为了进一步了解高浓度NTG对紫云英根瘤菌的影响,用浓度为1000微克/毫升的NTG作了诱变试验。结果见表5。

表5 1000微克/毫升NTG对紫云英根瘤菌的诱变效果

现瘤时间(天)	现瘤菌株数	结瘤频率(%)
6	2	2.5
6.5—7.5	10	12.5
8—9.5	1	1.3
10天以上	3	3.7
总 计	16	20.0

表 5 中测定的总菌数为 80 株,结瘤频率达到 20%,在培养温度同样不利的条件下,比结瘤频率只有 2% 的出发菌株子代有显著提高。表 4 和表 5 中可看出,1000 微克/毫升的 NTG 处理紫云英根瘤菌后,不仅结瘤菌株数提高,而且现瘤时间大大提前,最快的只要 6 天,比对照提前 4 天。

讨 论

1. $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线对紫云英根瘤菌的感染力有一定影响,但正变和负变效果没有规律性。这与 Чеверда 等^[5]的试验结果近似。

2. NTG 对紫云英根瘤菌的感染力有明显影响。随着浓度的提高,菌株感染力有增强的趋势。这与 Maier 等^[6]报告的 NTG 诱变根瘤菌的某些结果相类似。

3. 本实验中所用出发菌株有比较突出的自然分离现象,可能是由于出发菌株中原来就存在两类菌体(有感染力的和无感染力的);或者

是根瘤菌在分裂繁殖过程中,自然分离出无感染力的菌体。这现象值得深入研究。有人认为感染力的遗传因子存在于质粒上^[7],有可能在细胞分裂过程中这种质粒的复制不能与染色体的复制和细胞分裂同步进行,所以失去了感染力。对这一问题的深入研究,对根瘤菌的实际应用有一定指导意义。

参 考 文 献

- [1] Russell, P. E. and D. G. Jones: *J. Appl. Bacteriol.*, **36**: 567—573, 1973.
- [2] Имшенецкий, А. А., А. Н. Парийская и А. Э. Лопес: *Микробиология*, **39**: 343—347, 1970.
- [3] Парийская, А. Н.: *Микробиология*, **42**: 119—121, 1973.
- [4] Adelberg, E. A., M. Mandel and G. C. C. Chen: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**: 788—795, 1965.
- [5] Чеверда, М. Г. и Н. Н. Федулика: *Микробиология*, **46**: 560—563.
- [6] Maier, R. J. and W. J. Brill: *Science*, **201**: 448—450, 1978.
- [7] Beringer, J. E.: *Proc. First Inter. Symp. Nitrogen Fixation*, Vol. 2: 1976, p. 358—366.