

怪麻根瘤菌在非豆科作物体内的存活与繁殖

宁林夫 周春莲

(中国科学院武汉病毒研究所生物固氮组, 武汉)

以根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的 DNA 转化根瘤菌, 使根瘤菌能在非豆科植物上形成肿瘤, 早有报道^[1-3]; 通过接合途径使根瘤菌获得根癌农杆菌的 Ti 质粒, 进而在非豆科植物上形成肿瘤, 近来也有报道^[4]。但一般的根瘤菌单独或与其它细菌混合接种到非豆科植物上, 能在其内存活与繁殖, 尚未见报道。我们将怪麻根瘤菌与根癌农杆菌混合接种到番茄上, 发现根瘤菌能在番茄体内较长期地存活与繁殖。

一、材料与方 法

实验菌株是我们自行分离和进行抗药标记 (抗卡那霉素) 的怪麻根瘤菌第 2 号菌株 (简称“怪 2Km”), 抗链霉素的根癌农杆菌 (简称“农 Sm”, 未标记的原菌株引自中国科学院上海植

物生理研究所)。番茄品种为“武昌大红”, 供试株为长出 5—6 片真叶的盆栽实生苗。

将在甘露醇-酵母膏培养基 (简称 My) 上培养至对数期的“怪 2Km”、“农 Sm”菌液, 按 10:1 体积混合 (混合前菌液浓度: “怪 2Km”为 80 万/毫升, “农 Sm”为 125 万/毫升), 用注射器吸菌液刺接在番茄茎上部幼嫩处, 每株接种 5 点。对照为单独刺接“怪 2Km”或“农 Sm”或无菌水。接种后将植株置玻璃房内, 地面洒水保湿, 并遮荫。第 3 日早晨去掉遮荫物, 在自然光照和室温下生长。接种后第 8 天, 刺接“怪 2Km”+“农 Sm”或“农 Sm”的可见明显突起, 开始形成肿瘤。而刺接“怪 2Km”或无菌水的仅有刺接后愈合的痕迹。自第 10、18、36 天, 每次将每个处理切取 10 个肿瘤或 10 段有刺接点的

茎,先于 95% 酒精中浸泡 1 分钟,再在 0.2% 升汞中浸泡 4 分钟,随即用无菌水洗涤 6 次,然后分别置乳钵中研碎,用 48 毫升无菌水洗下移入 150 毫升三角瓶中(10 个肿瘤研碎后约有 2 毫升汁液),稀释后涂布在加有链霉素(600 微克/毫升)、卡那霉素(300 微克/毫升)和不加抗菌素的 My 平板上,待长出菌落后计数和挑单菌转接。观察菌落和菌体形态,并在怪麻和番茄上进行回接试验。

另外,取肿瘤(包括混合菌和单一菌形成的)装入试管内,用橡皮塞密封后注入 1/10 容积的乙炔,在 28℃ 下培养 6、24、48 小时,在气相色谱上测固氮酶活性。

二、结果

由于“怪 2Km”抗卡那霉素而不抗链霉素,“农 Sm”抗链霉素而不抗卡那霉素,所以混合菌接种番茄后所形成的肿瘤,在加有不同抗菌素的平板上即可获得不同的细菌菌落。在加有卡那霉素的平板上长出的菌落呈乳白色,粘稠,生长较慢,这是“怪 2Km”的特点。镜检菌体形态大小等也与该菌相同。在加有链霉素的平板上长出的菌落较透明,不粘稠,生长较快,这是“农 Sm”的特点。镜检菌体形态、大小等,也与“农 Sm”相同。这证明在混合菌形成的肿瘤中,不仅存在根癌农杆菌,而且存在怪麻根瘤菌。

在上述加有不同抗菌素的两种平板上长出的菌落,经转接后回接到番茄和怪麻上,回接试验结果表明,接种混合菌所形成的肿瘤中存在着两种细菌(表 1)。

表 1 “怪 2Km” + “农 Sm”形成的肿瘤分离出的菌体回接情况

菌体来源	回 接 植 物	
	怪麻	番茄
从加卡那霉素的平板上分离	结有效根瘤	不形成肿瘤
从加链霉素的平板上分离	不结瘤	形成肿瘤

肿瘤中分离出来的菌数,按每个肿瘤或刺接点的平均数列表 2。每次研磨肿瘤时,都未完全研碎,在显微镜下可以看到成团的细胞。

因此,实际肿瘤的含菌量比分离出来的菌数要多。

表 2 是一次试验结果,类似试验先后重复 5 次。每次都能从接种混合菌液的肿瘤中分离出大量的“怪 2Km”,而单独刺接“怪 2Km”时,分离出来的菌数很少。例如表 1 中单独刺接“怪 2Km”的仅为混合接种的 1.63%;在另一次试验中,接种 14 天以后,在混合菌所形成的肿瘤分离出的“怪 2Km”平均为 6.34×10^4 个,而单独刺接“怪 2Km”的接种点完全没有分离到细菌。

表 2 “怪 2Km” + “农 Sm”在番茄上形成肿瘤中分离出的细菌数(平均单瘤)

处理 (接种菌)	接种后不同时期分离出的细菌数(10^4)					
	第 10 天		第 18 天		第 36 天	
	“怪 2Km”	“农 Sm”	“怪 2Km”	“农 Sm”	“怪 2Km”	“农 Sm”
“怪 2Km” + “农 Sm”	5.50	10.00	15.00	153.75	3.20	270.00
“怪 2Km”	0.09	0	0	0	0	0
对照(无菌水)	0	0	0	0	0	0

混合菌液所形成的肿瘤或单独接种“农 Sm”所形成的肿瘤以及刺接“怪 2Km”和无菌水的对照,在气相色谱上均未测出固氮酶活性。这说明怪麻根瘤菌虽然在番茄体内存活与繁殖,但不能固氮。

此外,我们还将“怪 2Km”和“农 Sm”混合菌液刺接在开始拔节的玉米苗的第 1、2 个节间,21 天后取刺接部位的茎经表面灭菌研碎后,涂布在加有卡那霉素的 My 平板上,也分离出“怪 2Km”菌。经回接到怪麻上能结瘤固氮。但将上述菌液刺接在开始长出真叶的棉花苗茎上(下胚轴),21 天后未分离到细菌。

根据以上结果,可以认为:怪麻根瘤菌与根癌农杆菌混合接种到番茄上,能使怪麻根瘤菌在形成的肿瘤中较长期地存活与繁殖。

三、讨论

根瘤菌能在番茄体内存活与繁殖,证明在象番茄这样的非豆科作物体内具有根瘤菌生活的条件,但不具备固氮的条件,可能主要是番茄肿瘤中不存在豆科根瘤中那样的豆血红蛋白,固

氮酶的氧保护问题没有解决。除了考虑固氮基因的转移外,还必须考虑固氮酶的氧保护等问题。作者曾经将豇豆(桤麻根瘤菌的宿主之一)嫁接在番茄上,能够很好地成活,并在接穗豇豆上获得了种子,这也说明豇豆与番茄在生理上有一定的共同点。这些共同特性给桤麻根瘤菌能在番茄体内存活与繁殖提供了可能性。

单独接种根瘤菌于番茄上,分离出的菌数比混合接种的要少得多,其原因可能是根瘤农杆菌刺激植物细胞的迅速分裂,形成肿瘤,植物体内的营养物质较快地流向肿瘤组织,而根瘤

菌与根瘤农杆菌亲缘关系较近,在生理上有相似之处,二者可以共存,故根瘤菌能在里面较好地生长繁殖。

参 考 文 献

- [1] Klein, D. T. and Klein, R. M.: *J. Bacteriol.*, **66**: 220, 1953.
- [2] Kern, H.: *Arch. Microbiol.*, **66**: 63, 1969.
- [3] Парийская, А. Н.: *ИЗВ. АН СССР. сер. биол.*, **2**:189—198, 1974.
- [4] P. J. J. Hooykaas et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **98**: 477—484, 1977.