

# 花生根瘤菌诱变育种的研究

梁连登 庄敏玉 翁霭珍

(广州市微生物研究所)

1979年初我们从7个引进菌种中,选出表现较好的009及32H1两个菌种作为出发菌株。经过亚硝基胍(NTG)处理,平皿及试管粗

筛,水培初、复筛及连续三年(四季)多点田间试

本工作得到李季伦教授、莫熙穆教授指导,特此致谢。  
翁霭珍同志1980年9月起参加本项工作。

验,已选出侵染力,固氮酶活性及增产效能均优于出发菌株的 9-26 及 H-62 两个突变株,目前已应用于大面积生产。同时,结合菌种选育,初步探索了 NTG 对花生根瘤菌的诱变效应,结果报道如下。

## 材料与方 法

### (一) 出发菌株

花生根瘤菌 009 由中国农科院油料研究所选育; 32H1 由美国引进。

### (二) 诱变剂 NTG

用 pH6.0 磷酸缓冲液配制成浓度 0.3 mg/ml 的 NTG 溶液,用时稀释一倍。

### (三) 培养基

YMA 培养基(32H1 菌株,用甘油代替甘露醇)。

### (四) 处理方法

取一环对数生长期的根瘤菌苔于 5 ml pH 6.0 的灭菌磷酸缓冲液中,在有玻珠的三角瓶中振荡均匀。在 1ml 悬浮菌液内加入 1ml 0.3 mg/ml 浓度的 NTG 溶液,置于 28℃ 温箱中进行诱变处理 60 分钟。稀释后取 0.1 ml 菌液涂在含有 1g/L T. T. C (三苯基四氮唑氯化物)的 YMA 平板上,培养 7 天后,挑选显红色较早的菌落,分别移入根瘤菌斜面培养基上。

### (五) 筛选方法

由平板挑出的 1240 个诱变菌株,经比较菌苔生育状况,从中选出 203 个慢生型诱变株参加水培初、复筛试验。

初筛方法是粒选花生品种粤油 551 种子,具体方法见文献[1]。重复 5 次,调查株高、叶色、结瘤状况及植株重量,择优筛选。复筛用广口瓶进行,方法同上,结合测定菌株根瘤固氮酶活性,进行筛选。

### (六) 生理生化特性鉴定

常规方法。

### (七) 固氮酶活性的测定

按文献[2]进行。

### (八) 血清型鉴定

将各菌株的纯培养菌液制成相应的兔化抗

血清,然后进行各菌株(体抗原)的血清型鉴定

## (九) 田间小区试验

采用随机区组,重复 3 次,小区面积 5 厘,区间用沟隔开,每亩播种子 24,000 粒左右。

## 结果与讨论

### (一) 不同浓度 NTG 处理对花生根瘤菌的诱变效应

用不同浓度的 NTG 处理 009 和 32H1 菌株。诱变结果表明: NTG 对花生根瘤菌的致死率,随浓度增加而提高。但不同菌株反应不同,32H1 的致死率高于 009。此外,NTG 处理后,两菌株有 1.14—9.86% 的诱变菌株提高了有效性;但也有 98.86—87.32% 诱变菌株丧失了有效性。009 有效正变率比 32H1 高(表 1)。

### (二) NTG 对花生根瘤菌感染力的影响

根据 8 次水培试验结果,看出 NTG 对花生根瘤菌感染力有明显的影 响,正变和负变都有。同一出发菌株,低浓度 NTG 比高浓度正变效果大(表 2)。

### (三) 花生根瘤菌 9-26 及 H-62 突变株的选育

粗筛后选出的 203 个诱变菌株,经过水培初、复筛试验,选出现瘤期比出发菌株早 2 天以上,单株结瘤数增加 1 倍左右的有效诱变株 6 株。将 6 菌株制成菌剂,经过三年(四季)共 23 次田间鉴定,及 13,500 亩大田接种试验,最后选出 9-26 及 H-62 两个优良突变菌株。

1. 9-26 及 H-62 菌株的生理特性:按照常规方法,对二菌株的利用碳源情况, B. T. B 变色及刚果红吸色反应以及耐盐性等进行了试验。结果证明二菌株在生理特性上产生了一些变异(见表 3)。

2. 二菌株的血清型鉴定:用免疫家兔制备 9-26、H-62、0.09 及 32H1 抗血清,分别与相应的 4 种抗原进行交叉凝集反应试验(表 4)。

从表 4 可见,9-26 菌株与其他 3 株菌凝集效价差异很大,其血清型已产生明显变化。H-62 菌株虽与 9-26 及 009 菌株差异很大,但与

表 1 NTG 对花生根瘤菌诱变的影响

NTG 浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	指标		死亡率 (%)		测定菌株数		无效菌株数		相等菌株数		有效菌株数*		正变率 (%)	
	菌种													
			009	32H1	009	32H1	009	32H1	009	32H1	009	32H1	009	32H1
150			12.84	20.75	71	88	62	87	2	0	7	1	9.86	1.14
500			27.40	65.00										
1000			70.64	75.37	44	—	28	—	3	—	3	—	6.82	—

\* 指比出发菌株现瘤期早、结瘤数增加、植株干重提高的诱变菌株。

表 2 NTG 对花生根瘤菌感染力的影响

NTG 浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	出发菌株	测定菌株数	结瘤菌株数	结瘤频率 (%)	处理菌株与出发菌株比较			
					提前现瘤菌株	同时现瘤菌株	推迟现瘤菌株	未现瘤菌株
150	32H1	88	27	30.68	15	12	0	61
150	009	71	52	73.24	25	13	14	19
500—1,000	009	44	30	68.18	—	11	15	14

表 3 不同菌株在不同培养基上的生长情况

菌株	培养基	酵母汁 甘油	酵母汁 蔗糖	酵母汁 甘露醇	酵母汁 葡萄糖	B. T. B	刚果红	0.2% NaCl	1/5000 结晶紫	马铃薯块
9-26		++	+++	++++	+++	蓝色	不吸色	+++	+	—
009		++	+++	++++	++++	淡蓝	吸色	++	+	—
H-62		+++	+	+++	++	蓝色	不吸色	++	+	+
32H1		++++	+	++	++	淡蓝	不吸色	+++	++	++

出发菌株 32 H1 凝集效价相近,故仍属同一血清型。

3. 二菌株的侵染力: 田间试验表明: 9-26 及 H-62 菌株结瘤数量, 在整个花生的生育期中, 均大大超过出发菌株 (表 5)。

4. 二菌株的固氮酶活性: 测定表明, 9-26 及 H-62 菌株的根瘤固氮酶活性, 无论在水培或田间条件下, 均高于出发菌株 (见表 6)。

5. 二菌株的田间接种效果: 1980—1982 年在广州市郊、花县、增城、番禺、三水及清远等地进行了 23 次田间试验。结果表明, 9-26 及 H-62 菌株的接种效果均优于出发菌株。其中 9-26 菌株的平均增产率为 12.68%, 比 009 菌株提高 7.79%, 达极显著标准; H-62 菌株的平均增产率为 9.92%, 比 32 H1 菌株提高 3.66%, 比 009 菌株提高 5.03% (表 7)。

1982—1983 年上述地区大田接种效果表

表 4 不同菌株交叉凝集反应

菌株 (抗原)	凝集效价	抗血清			
		9-26	009	H-62	32H1
9-26	3200	400	200	200	
009	400	3200	400	400	
H-62	200	400	6400	3200	
32H1	200	400	3200	6400	

表 5 接种 9-26 及 H-62 菌株后花生结瘤情况\*

菌株	结瘤数(个/株)			收获期根瘤鲜重 (g/株)
	7 叶期	10 叶期	收获期	
9-26	61.53	137.54	188.03	0.560
009	43.63	114.47	165.26	0.414
H-62	60.48	137.58	191.37	0.616
32H1	31.28	114.73	131.21	0.400
对照	28.16	94.32	152.71	0.407

\* 根据 19 个试验点、57 次调查结果整理。

表6 不同菌株的根瘤固氮酶活性 (nMC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/株·时)

菌株 固氮酶活性 处理	9-26	009	H-62	32H1
	水培	1791.07	1255.12	2326.87
田间*	15856.19	10540.17	15198.53	10897.89

\* 根据9个试验点的11次测定整理。

表7 9-26及H-62菌株的田间接种效果

菌株	株高 (cm)	分枝 (个/株)	茎叶鲜重 (g/株)	总果数 (个/株)	饱果数 (个/株)	百果重 (g)	亩产(斤)	增产斤数 (斤/亩)	增产率 (%)
对照	56.39	5.15	40.50	14.50	9.11	122.48	320.54		
009	52.58	5.24	41.72	15.76	9.63	125.71	336.21	15.67*	4.89
9-26	55.63	5.41	46.54	16.67	10.93	127.03	361.18	40.64**	12.68
32H1	54.86	5.40	39.66	16.40	10.10	125.80	340.61	20.07**	6.26
H-62	56.78	5.68	50.30	17.52	10.80	128.90	352.27	31.73**	9.92

\* 超过5%显著标准, \*\* 超过1%显著标准。

明,9-26菌株的增产百分数为12.1—13.5%,每亩净增花生44.8—46.1斤;H-62菌株为10.4—10.9%,每亩净增花生37.1—38斤(均为多点测定平均数)。

### 参 考 文 献

- [1] 豊田広三: 土壤微生物实验法, 216—231, 1975。  
 [2] 上海植物生理研究所固氮室: 植物学报, 16(4): 382—384, 1974。