

紫云英根瘤菌结瘤能力的研究

李 仲 贤

(湖南省微生物研究所,长沙)

在科研和生产实践中发现,根瘤菌会自发丧失结瘤能力,经吡啶橙处理^[1]和热处理^[2]后,其结瘤性能更易丧失。本文报道紫云英根瘤菌结瘤性能自发的和经吡啶橙与热处理诱导的变异。

材 料 与 方 法

1. 菌株: 将紫云英根瘤菌 106 菌株稀释分离后得到一批单菌落,把它们分别移接到酵母汁-甘露醇-琼脂(以下简称 YMA)斜面上,得分离菌株;经四次结瘤试验,从中选出每次均结瘤,而且现瘤早、瘤数多的一个分离菌株(Ra 106-L.)作为本研究的出发菌株。每次试验均用 Ra106-L. 在 28℃ 振荡培养 16 小时的无杂菌种子液进行。

2. 紫云英根瘤菌培养基: 固体培养用“YMA 培养基”,液体培养用“YM”培养基。

3. 紫云英幼苗培养基及结瘤试验: 参照文献[3]进行。

4. 吡啶橙(Acridine orange)贮备液: 用灭菌蒸馏水配制含吡啶橙 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的原液,盛于棕色瓶中,在低温下存放一周后使用。

5. 出发菌株 Ra106-L. 的免疫血清: 按文献[4]的方法制备。

6. 吡啶橙处理方法: 先配制浓缩一倍的 YM 培养液,同时配制一系列比所需浓度高一倍的吡啶橙溶液;使用时取上述两液等量混合即得符合要求的吡啶橙处理液。在每个 250ml 三角瓶里盛吡啶橙处理液 20ml,接入 0.1 ml 根瘤菌种子液,在 28℃ 振荡培养一定时间后,用各种浓度的吡啶橙处理液稀释分离得到单菌落,从平皿上随机挑出 20—30 个紫云英根瘤菌菌

落,每个菌落接 2 支 YMA 斜面,由同一菌落移接的两支斜面编为同一号码,置 28℃ 培养,待菌苔丰满后,将其中一支用作结瘤试验,另一支保藏。

7. 热处理方法: 在每个 250ml 三角瓶里盛 YM 培养液 20ml,灭菌后接根瘤菌种子液 1ml,分别置 28、35、37℃ 培养,每天定时摇动 3 次。一组按 Zurkowski 等的方法^[2],在 35℃ 培养 7 天;另一组按 Hooykaas 等的方法^[5],在 37℃ 保温培养 2 天。培养一定时间后,将不同温度下的处理液按照吡啶橙处理方法稀释分离,获得供试分离菌株。

8. 不结瘤菌株的血清学鉴定: 以出发菌株 Ra106-L. 的免疫血清为凝集素,以不结瘤菌株为凝集原,在电解质存在下进行直接凝集反应。根据凝集效价来判定不结瘤菌株与出发菌株的亲缘关系。

结 果

(一) 紫云英根瘤菌自发产生的不结瘤变异

对紫云英根瘤菌进行吡啶橙处理和热处理时,共设了 7 个对照处理。在供试的 170 个分离菌株中,有 19 个不结瘤,自发产生的不结瘤突变率为 $11.2 \pm 9.5\%$,与 Higashi (1967)^[1] 在三叶草和菜豆根瘤菌里获得的试验结果相同。

(二) 吡啶橙处理对结瘤性能的影响(见表 1)

高浓度的吡啶橙对紫云英根瘤菌有强烈致死作用;本试验使用的吡啶橙处理液浓度分别

本研究承陈华葵教授指导,谨致谢忱。

表 1 吡啶橙对根瘤菌结瘤性能的影响

结 果 试验次数	项 目 吡啶橙浓度 $\mu\text{g/ml}$	菌数(细胞数/ml)		供试菌 株数 (个)	不结瘤菌 株数 (个)	不结瘤突 变率 (%)	每个结瘤 菌株平均 结瘤数 (个)
		开 始	终 止				
第 一 次	0	1.2×10^8	32×10^8	20	3	15	16.1
	5	1.2×10^8	17×10^8	20	0	0	13.4
	10	1.2×10^8	3×10^8	20	0	0	8.9
	20	1.2×10^8	0.33×10^8	20	0	0	10.5
第 二 次	0	54×10^4	24.1×10^4	30	7	23.3	9.4
	5	54×10^4	12×10^4	30	10	33.3	9.3
	10	54×10^4	1.4×10^4	30	9	30.0	8.2
	20	54×10^4	0.15×10^4	30	22	73.3	13.8

表 2 热处理对根瘤菌结瘤性能的影响

试验次数	处理时间 (天)	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	菌数(细胞数/ml)		供试菌 株数 (个)	不结瘤菌 株数 (个)	不结瘤突 变率 (%)	每个结瘤 菌株的平均 结瘤数 (个)
			开 始	终 止				
1	2	28	1.2×10^8	1.8×10^8	20	0	0	12.5
		37	1.2×10^8	1.3×10^8	20	2	10	11.95
2	7	28	1.2×10^8	23.2×10^8	20	0	0	9.3
		35	1.2×10^8	5.8×10^8	20	2	10	9.4
		37	1.2×10^8	0.38×10^8	20	1	5	6.1
3	2	28	0.56×10^8	5.1×10^8	25	1	4	16
		37	0.56×10^8	0.16×10^8	25	7	28	16.7
4	8	28	0.56×10^8	17×10^8	25	2	8	15.4
		35	0.56×10^8	0.24×10^8	25	2	8	14.4
		37	0.56×10^8	0.007×10^8	25	14	56	14.1
5	7	28	1.03×10^8	44.7×10^8	30	6	20	16.2
		35	1.03×10^8	0.5×10^8	30	2	6.7	9.2

为 0、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 。

在第一次试验中,根瘤菌的接种量为 1.2×10^8 个细胞/ml,接种后在 28°C 振荡培养 2 天,从含吡啶橙的各处理中选出的 60 个分离菌株作结瘤试验,结果都能结瘤,与 Parijskaya 的苜蓿根瘤菌试验结果^[6]和 Zurkowski 等的三叶草根瘤菌试验结果^[7]一致。

在第二次试验中,根瘤菌的接种量为 54×10^4 个细胞/ml,接种后在 28°C 振荡培养 7 天,从含吡啶橙的各处理中选出的 90 个分离菌株作结瘤试验,其中有 41 个菌株不结瘤,不结瘤突变率为 $45.5 \pm 24.1\%$,这与 Higashi (1967)用

吡啶橙处理三叶草和菜豆根瘤菌^[1]所获得的结果相符。

(三) 热处理对结瘤性能的影响 (见表 2)

紫云英根瘤菌于 35°C 培养 7 或 8 天,在三次试验中的 75 个供试分离菌株中,有 6 个菌株不结瘤,不结瘤突变率为 $8.2 \pm 1.7\%$ 。于 37°C 分别培养 2、7、8 天,在四次试验的 90 个供试分离菌株中,有 24 个不结瘤,不结瘤突变率为 $24.8 \pm 23.1\%$ 。此结果与 Zurkowski 等^[2]和 Hoo-ykaas 等^[5]对三叶草根瘤菌进行热处理的试验结果一致。

(四) 不结瘤菌株的鉴定

在吡啶橙和热处理的各次试验中,共获 90 个不结瘤菌株。其培养和形态特征与其对应的结瘤菌株一样,在 YMA 斜面培养基上能迅速生长,单个菌落圆形,边缘整齐,乳脂色,有光泽,产粘液,大小约为 $0.5-0.9 \times 1.2-3.0 \mu\text{m}$,为革兰氏阴性杆菌。经三次以上的植物回接试验,确证均不结瘤。90 个不结瘤菌株经血清学鉴定,凝集效价为 6400 的有 43 个,凝集效价为 3200 的有 47 个,与出发菌株 Ra106-L. 的凝集效价(为 6400)相同或接近,证明它们是出发菌株 Ra106-L. 的后代。

讨 论

1. 综上所述,这 90 个不结瘤菌株虽然丧失了紫云英根部结瘤的能力;但仍然保留着紫云英根瘤菌的形态、生理和免疫特征。它们不是杂菌,而是出发菌株 Ra106-L. 的不结瘤突变体。

2. 寄主选择性、侵染性和有效性是根瘤菌和豆科植物共生固氮最重要的遗传特征。近年来,日益增多的物理、化学和遗传学证据均表

明:决定根瘤菌上述遗传特征的基因(或者至少有一部分基因)被编码在质粒上^[8]。从紫云英根瘤菌自发的不结瘤变异率很高,采用消除质粒的手段(吡啶橙处理和热处理)又能促使它丧失结瘤能力等现象来看;与它的寄主选择、侵染、结瘤和固氮等有关的基因,也可能定位在质粒上。根瘤菌质粒的研究必将推进共生固氮机理的阐明和共生固氮范围的扩大。

参 考 文 献

- [1] Higashi, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**: 391—403, 1967.
- [2] Zurkowski, W. and Lorkiewicz, Z.: *Genetical research*, **32**: 311—314, 1978.
- [3] 曹燕珍、李卓棣: 微生物学通报, **6**(4): 7—9, 1979.
- [4] 中国农科院土肥所生物固氮组: 农业科技通讯, **3**: 24—25, 1979.
- [5] Hooykaas, P. J. J. et al.: *Nature*, **291**: 351—353, 1981.
- [6] Parijskaya, A. N.: *Mikrobiologiya*, **42**: 119—121, 1973.
- [7] Zurkowski, W. and Lorkiewicz, Z.: *Arch. Microbiol.*, **123**: 195—201, 1979.
- [8] Eeringer, J. E. et al.: *Heredity*, **45**(2): 161—186, 1980.