



花生根瘤菌抗药性菌株的选育

刘荣昌 李凤汀 曾广勤

(河北省科学院微生物研究所,保定)

王 阁 赵晓塘 刘学军 张晓梅

(河北大学生物系,保定)

花生接种根瘤菌有明显的增产效果,但是在老种植区,由于土壤中存在大量的根瘤菌,人工接种效果不佳。解决这个问题关键是选育竞争力与感染力强和固氮效率高的菌株。本文主要报道,用抗药标记法选育优良菌株和鉴定人工接种效果。

材 料 和 方 法

(一) 出发菌株

花生根瘤菌 [*Rhizobium* sp. (*Arachis hypogaea*)] 97-1, 中国农科院油料所提供; 豇豆根瘤菌 [*Rhizobium* sp. (*Vigna sinensis*)] 32H₁, 中国农科院土肥所从美国引进。

(二) 供试花生品种

伏花生 (*Arachis hypogaea* Linn.)

(三) 抗生素

硫酸链霉素 (Sm), 硫酸卡那霉素 (Km), 华北制药厂生产。

(四) 培养基 (g/L)

葡萄糖 7、甘油 3、K₂HPO₄ 0.5、MgSO₄·7H₂O 0.2、NaCl 0.1、CaCl₂·6H₂O 0.2、酵母汁 0.8、H₃BO₃ 0.01、Na₂MoO₄·2H₂O 0.01、水 1000ml, pH6.5—7.0, 加 1% 浓度刚果红溶液 2.5 ml 作指示剂, 121℃ 灭菌 30 分钟备用。固体培养时加 18—20g 琼脂, 测定固氮酶活力时加琥珀酸钠 4.5g。

(五) 抗药菌株的选育方法

取对数期的菌种悬液 1ml 接入 100ml 液体培养基中, 振荡培养, 分别于 24、48、72 小时加

入 100u/ml 链霉素或卡那霉素, 继续培养 5—7 天, 至培养液混浊略带粘稠为止, 取此培养液 1 ml 于平皿中, 再加入含 1000 u/ml 链霉素或 800u/ml 卡那霉素的培养基, 摇匀, 制成含药接种平板, 置 28℃ 温箱培养 7—10 天, 选单菌落纯化后转入斜面, 供筛选。

(六) 固氮酶活力测定

采用乙炔还原法, 在 102G 型气相色谱仪上测定乙烯的生成量, 以 nmolC₂H₄/mg 蛋白/小时或 nmolC₂H₄/株瘤/小时表示。

(七) 结瘤试验

选自生固氮酶活高的菌进行结瘤试验和回收率的测定。

1. 水培法: 选用 Lensen 无氮营养液^[1]。待花生种子的胚根伸长 5 cm 时, 用 1×10⁷ 细胞浓度的出发菌株和突变体菌株的菌悬液浸根, 定植在装有无氮营养液的水培器中, 每个水培器两株, 三次重复。在人工气候箱培养, 湿度 75%, 温度 22—28℃, 每天光照 14 小时, 光照强度为 11,000—18,000lx。盛花期收获, 测定植株高度、干物重、结瘤数等指标, 固氮效率、含氮量及突变体抗药稳定性。

2. 土培法: 取过筛的花生地土壤 25 斤装入 30×35 cm 的瓷盆中, 花生种子用出发菌株和突变体菌悬液浸种后播种, 每盆定苗 3 株。同时进行田间微区试验, 面积 2 平方米, 重复四次。收获期与测定项目同水培法。

赵树斌、李春辉、高江涛三位同志参加部分工作。

表 1 出发菌株的耐药能力

菌株	硫酸链霉素 u/ml						硫酸卡那霉素 u/ml						空白对照
	5	10	25	50	100	200	5	10	25	50	100	200	
97-1	+++	++	+	+	-	-	++	+	-	-	-	-	++++
32H ₁	+++	++	+	-	-	-	+++	++	+	+	-	-	++++

注: ++++强, +++较强, ++良好, +差, -不长。

结果与讨论

(一) 抗药菌株的获得

花生根瘤菌 97-1、豇豆根瘤菌 32H₁ 对链霉素和卡那霉素的自然耐药能力见表 1。

菌株的抗药性属于基因突变, 因此加药时间是获得突变体的关键, 据试验接种对数期的菌种, 培养 24 小时, 加入链霉素或卡那霉素, 获得 107 株抗药突变体, 而培养 48、72 小时加入抗生素, 分别获得 46 株、39 株抗药突变体。表明培养 24 小时正是 DNA 复制的高峰, 加入抗生素容易改变 DNA 分子某一位置的结构。但是获得的抗药突变体并不都保持原菌株的固氮能力。据测定, 抗链霉素 106 株突变体、抗卡那霉素 86 株突变体中, 各有 6 株固氮酶活力接近或高于出发菌株, 分别占 5.6% 和 7.0%, 其余有 69% 左右的突变体固氮酶活力降低, 还有 24% 的突变体完全丧失了固氮酶活力。这可能是抗生素改变 DNA 分子固氮基因结构的结果。通过测定选出 3 株抗 1000u/ml 链霉素的突变体 S^r212、S^r236、S^r251 和 2 株抗 800u/ml 卡那霉素的突变体 K^r233、K^r361, 其纯培养时固氮酶活力见表 2。并进行结瘤试验。

(二) 突变体结瘤效果及回收率

1. 水培试验结果: 花生接种抗药突变体, 以原出发菌株作对照, 经 29 天培养进入初花期。据测定, 接种突变体与接种出发菌株相比, 接种突变体的花生株高增加 1.6—13.5%, 干物重只有 S^r236 增加 25.4%, 总氮量除 K^r361 外均增加 11.3—45.2%; 现蕾时间接种 S^r212、K^r233、S^r236 的与出发菌株相似; S^r251 丧失了结瘤能力; K^r361 培养到 27 天才现瘤, 经测定无

表 2 抗药突变体固氮酶活力 (nmolC₂H₄/μg 蛋白/小时)

菌株	酶活力			培养时间 (天)		
	7	10	14	7	10	14
97-1	0.33	1.18	17.55			
S ^r 212	2.64	11.97	24.15			
K ^r 233	0.30	0.76	11.24			
32H ₁	0.23	0.39	10.06			
S ^r 236	0.28	3.21	30.55			
S ^r 251	0.18	0.38	10.41			
K ^r 361	0.34	0.60	18.71			

固氮酶活力属无效瘤。可见固氮和结瘤是由两个不同的基因组控制着, 经抗生素处理, 不仅影响固氮基因结构, 也改变了结瘤基因结构。接种 S^r212、S^r236 的植株根瘤数比出发菌株多 50—264.5%, 鲜瘤重增加 7.1—275.0%; K^r233 固氮酶活力比出发菌株提高 104.9%; 突变体的固氮效率均比出发菌株增加, 其中 S^r236、K^r233 提高 119.7—265.4% (见表 3)。从试验植株根上取较大根瘤, 经表面消毒后挤瘤汁回接在含 1000 u/ml 链霉素和 800 u/ml 卡那霉素的平板上, 结果只有接种 S^r212、S^r216、K^r233 突变体的根瘤才出现菌落, 表现出抗药能力的稳定性。

2. 土培法及微区试验结果: 选择水培结瘤多, 共生固氮酶活及固氮效率高的 S^r212、S^r236、S^r9 (未参加同期水培试验)、K^r233 突变体接种花生进行土培试验, 以出发菌株为对照。据花期测定, 接种突变体的植株干重与出发菌株相近, 主根的结瘤数增加, 其中 S^r212、S^r236、S^r9 比出发菌株增加 1—11.7 倍, 但侧根结瘤数增减表现不一。共生固氮效率也比出发菌株提高 72—387%。从不同处理的植株主根上摘 20

表3 抗药菌株对植株生长及共生固氮作用

菌株	主茎高 (cm)	干物重 (g/株)	总氮量 (mg/株)	结瘤时间 (天)	瘤数 (个/株)	鲜瘤重 (g/株)	固氮酶活力 ($\text{nmolC}_2\text{H}_4/\text{g瘤/时}$)	固氮效率 ($\text{nmolC}_2\text{H}_4/\text{g株瘤/时}$)
97-1	19.3	0.86	12.63	16	54.8	0.14	8265.6	1156.2
S ^r 212	16.9	0.78	15.52	17	82.2	0.15	8387.4	1258.2
K ^r 233	19.6	0.82	18.37	16	47.0	0.15	16936.2	2540.4
32H ₁	17.8	0.71	17.11	18	17.2	0.04	3261.6	129.0
S ^r 236	20.2	0.89	19.94	18	62.7	0.16	2975.4	475.8
S ^r 251	17.6	0.70	19.04	—	0	0	0	0
K ^r 361	18.5	0.79	16.12	27	4.3	0.01	0	0

表4 抗药突变体结瘤与回收率

菌株	植株干物重 g/株	根瘤数 个/株			固氮效率 $\text{nmolC}_2\text{H}_4/\text{株瘤/时}$	回收率 %
		总瘤数	主根瘤	侧根瘤		
97-1	9.21	127	20	107	403.3	0.00
S ^r 212	9.35	93	41	52	698.7	75.20
K ^r 233	8.33	71	23	48	1966.5	93.00
32H ₁	8.69	28	14	14	378.9	0.00
S ^r 236	—	115	51	64	—	84.00
S ^r 9	9.38	134	47	87	651.3	92.50

个根瘤,分别回接在含1000u/ml链霉素和800u/ml卡那霉素的培养基平板上,结果接种S^r212、S^r236、S^r9、K^r233突变体的根瘤大多出现根瘤菌菌落,回收率为75—93%,而接两个出发菌株的根瘤则未出现菌落。从土培试验可见,突变体S^r212、S^r236、S^r9、K^r233在土壤环境里比原有根瘤菌的竞争、侵染、结瘤能力均强,固氮效率比出发菌株有所提高,保持了稳定的抗药能力和固氮作用。

综上所述,采用链霉素和卡那霉素处理花生根瘤菌,可引起基因突变,与出发菌株比较,大多数属于负突变型,有些突变体则完全丧失固氮和结瘤的能力,只有少数突变体保持或提

高固氮与结瘤性能,这与Парийская等的试验结果相似^[2]。本试验获得的S^r212、S^r236、S^r9、K^r233标记菌株抗药性稳定,与出发菌株比较具有自生固氮酶活高、结瘤多、共生固氮效率高的优点,接种于花生确有促进生长,增加干物重的好效果。尤其在花生老种植区接种便于追踪观察,有一定的应用价值。

参 考 文 献

- [1] J.M.芬特森特著:根瘤菌实用研究手册,第一版,中国科学院上海植物生理研究所固氮研究室译,上海人民出版社,上海,1974。
- [2] A. Н. Парийская и Т. А. Калининская: Микробиология, 47 (6): 1120—1121, 1978.