

旋扭山绿豆快生型根瘤菌不结瘤突变株的分离

林德球 黄才* 王黎

(华南师范大学分子生物工程研究中心, 广州 510631)

摘要 旋扭山绿豆快生型根瘤菌 DI202 菌株在吡啶橙 (20 μ g/ml, 30 μ g/ml) 的作用下 (28 $^{\circ}$ C 培养 7 天), 可以诱发不结瘤 Nod⁻ 突变株。从单菌落结瘤试验表明, Nod⁻ 突变个体占群体数的 10—20%。随机挑取的未经吡啶橙处理的 20 个单菌落的回接试验, 旋扭山绿豆植物能正常地结瘤固氮。说明控制结瘤作用的基因对吡啶橙处理敏感。

关键词 旋扭山绿豆; 快生型根瘤菌; 不结瘤突变株; 吡啶橙

Higashi^[1]最先用质粒消除 (吡啶橙处理) 和接合试验的方法推断三叶草根瘤菌的结瘤能力是由一种附加因子 (质粒) 控制的。Zurkowschi^[2]用热处理的方法获得三叶草根瘤菌的不结瘤突变株, 证明三叶草根瘤菌携有一个控制结瘤特性的 Sym 质粒。目前一些研究者认为^[3,4], 绝大多数快生型根瘤菌的结瘤能力是由一共生质粒所控制, 但也有例外。Masterson^[4]的研究表明, USDA194 控制结瘤的基因不在质粒上, 而在染色体上。为了弄清旋扭山绿豆快生型根瘤菌的结瘤基因 (Nod⁺) 是否位于质粒上, 我们采用消除质粒的手段进行了初步研究, 现报告如下。

材料与 方法

(一) 材料

1. 供试菌株: 本校分子生物工程研究中心从旋扭山绿豆根瘤中分离的快生型根瘤菌株。
2. 供试植物: 旋扭山绿豆种子来源于本校生物系牧草试验基地。
3. 培养基: (1) 根瘤菌用 LMSY 培养基^[9]。(2) 植物无氮培养基 (g): K₂HPO₄ 1, MgSO₄ 1, 0.5% H₃BO₃ 4ml, CaCO₃ 0.2, FeSO₄ 微量, 0.5% Na₂MoO₄ 4ml, 琼脂 10, 水 1000 ml。(3) 旁氏植物营养液 (g): KCl 0.317, Ca₃(PO₄)₂ 0.18, CaSO₄ · 2H₂O 0.137, MnSO₄ · H₂O 0.006, K₂HPO₄ 0.268, MgSO₄ · 7H₂O 0.055, Fe₂(SO₄)₃ 0.027, H₃BO₃ 0.005, 水

1000ml.

(二) 方法

1. 吡啶橙 (Acridine orange) 贮备液: 按文献^[9]配成 1000 μ g/ml 的原液备用。
2. 硫酸链霉素 (Sm) 抗性突变株的筛选: 用灭菌的称量瓶称取所需量的硫酸链霉素 (200—500 μ g/ml), 用少量无菌水溶解后, 加入融化好的 LMSY 固体培养基中, 倒皿备用。按照宁林夫等^[8,10]的方法, 每皿接入细菌细胞 > 10⁸/ml, 涂布均匀后置 28 $^{\circ}$ C 培养, 挑取单菌落保存于 LMSY 斜面上。
3. 生长曲线的测定: 250ml 的三角瓶内装 80ml 含吡啶橙 (AO) 30 μ g/ml 的 LMSY 培养基, 接种后 28 $^{\circ}$ C 150r/min 振荡培养 7 天。每隔 24 小时取样于 721 型分光光度计测一次菌液浊度, 空白用含 AO 30 μ g/ml 的 LMSY 培养基。对照组为不加吡啶橙的菌体培养液。
4. 吡啶橙处理方法: 向 LMSY 液体培养基中加入吡啶橙贮备液, 配制所需浓度的吡啶橙处理液。在每个 250ml 三角瓶里盛吡啶橙处理液 80ml, 用接种环接入斜面菌种一环, 在 28 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养 7 天。用各种浓度的吡啶橙处理液稀释铺板。培养后, 从平皿上随机挑出 10—15 个根瘤菌的单菌落。每个菌落接两支 LMSY 斜面, 这两支斜面编为同一号码, 置 28 $^{\circ}$ C 培养。待菌苔丰满后, 将其中一支作结瘤

* 现在广东医学院生化教研室。

试验,另一支保存。按同样的方法做对照组。

5. 植物结瘤试验: (1) 旋扭山绿豆种子的处理: 参照文献 [6] 的方法消毒种子表面。把消毒的种子在无菌培养皿中摊开, 20—25℃条件下催芽 2 天。(2) 试管结瘤试验: 选芽长约 0.2cm 的种子, 放入盛有根瘤菌悬液的培养皿中, 浸泡半小时。用接种环将根尖朝下接种到圆柱形琼脂上; 于室温下培育, 每天光照 16 小时。(3) 盆栽砂培法: 种子浸泡在根瘤菌悬液中半小时, 播种在灭菌的塑料沙盆中, 供以 150ml 旁氏植物营养液, 培养条件同上。

结 果

(一) 吡啶橙对根瘤菌生长和存活的影响

高浓度的吡啶橙(AO)对根瘤菌有强烈的致死作用。本试验使用吡啶橙的浓度分别为 0、20 和 30 $\mu\text{g/ml}$ 。菌株 DI202 (Sm^r) 的正常生长曲线和在 30 $\mu\text{g/ml}$ 吡啶橙的生长曲线表明(图 1), 吡啶橙对菌株 DI202 (Sm^r) 的生长有较强的抑制作用。培养后期菌液混浊度的下降与培养时间的延长和菌体发生自溶有关。

(二) 吡啶橙对根瘤菌结瘤性能的影响

从菌株 DI202 (Sm^r) 分离的单菌落的结瘤能力(表 1)和用不同浓度吡啶橙处理对根瘤菌结瘤能力的影响(表 2)两次试验结果中看出, 对照组中选出的 21 个单菌落都能结瘤。这一结果与李仲贤^[9]研究的紫云英根瘤菌的结瘤结果有差异, 表明旋扭山绿豆快生型根瘤菌株不容易丧失结瘤能力。从含吡啶橙的各处理中选出的 25 个单菌落作结瘤试验, 有 4 个菌落不结瘤, 不结瘤突变率为 16 \pm 5%, 其结果低于 Higashi^[11]用吡啶橙处理三叶草和菜豆根瘤菌所获结果及李仲贤^[9]用吡啶橙处理紫云英根瘤菌的结果, 表明菌株 DI202 (Sm^r) 具有较强的吡啶橙耐受能力。

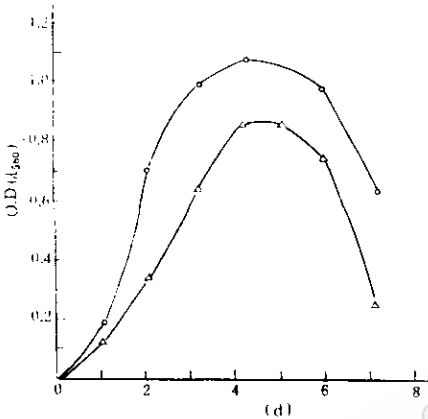


图 1 DI202 (Sm^r) 菌株的正常的和吡啶橙处理的生长曲线图

---○--- 对照 ---△--- 吡啶橙处理

表 1 从菌株 DI202 中分离的单菌落的结瘤试验

第一次试验吡啶橙的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)				第二次试验吡啶橙的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)			
0		20		0		30	
菌株	结瘤情况	菌株	结瘤情况	菌株	结瘤情况	菌株	结瘤情况
0211	+	0221	-	1101	+	1112	+
0212	+	0222	+	1102	+	1113	+
0213	+	0223	+	1103	+	1114	-
0214	+	0224	+	1104	+	1115	+
0215	+	0225	+	1105	+	1116	+
0216	+	0226	+	1106	+	1117	-
0217	+	0227	+	1107	+	1118	+
0218	+	0228	+	1108	+	1119	+
0219	+	0229	+	1109	+	1120	+
0220	+	0230	+	1110	+	1121	+
				1111	+	1122	-
						1123	+
						1124	+
						1125	+
						1126	+

表2 吡啶橙处理对根瘤菌结瘤性能的影响

结瘤 试验时间	项目 吡啶橙浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	试验菌株数	不结瘤菌株数	不结瘤突变率 (%)
第一次试验	0	10	0	0
	20	10	1	10
第二次试验	0	11	0	0
	30	15	3	20

(三) 不结瘤突变株的鉴定

旋扭山绿豆快生型根瘤菌经浓度为20和30 $\mu\text{g/ml}$ 吡啶橙处理,共获4个不结瘤突变株,其培养的形态特征与其对应的出发菌株一致。在LMSY培养基上能迅速生长。单个菌落为圆形,边缘整齐的半透明、粘液状菌落。经吡啶橙处理作质粒消除试验的出发菌株具有Sm^r标记,用于第一次试验的出发菌株DI202(Sm^r500)对硫酸链霉素浓度为500 $\mu\text{g/ml}$ 有抗性。用于第二次试验的出发菌株DI202(Sm^r200)对硫酸链霉素200 $\mu\text{g/ml}$ 有抗性。而所选的4个AO(Nod⁻)突变株仍具有相应的Sm^r标记。因而我们认为这些AO(Nod⁻)突变株是野生型DI202(Sm^r)的后代,不是污染的杂菌。

讨 论

1. 用吡啶橙处理能促使旋扭山绿豆快生型根瘤菌DI202结瘤能力的丧失,但在本试验所用的吡啶橙浓度内,不结瘤突变率仅为16 \pm 5%,低于Higashi^[1]等的结果。由于吡啶橙对菌株DI202有较强的抑制作用,不能无限增大吡啶橙的浓度,因此,能否选用适当的吡啶橙浓度或其它方法来提高不结瘤突变率还有待进一步研究。

2. 根瘤菌最显著的特点是能侵染相应的豆科植物根系,形成根瘤。近年来,由于快速筛选根瘤菌共生突变体技术^[11],和Tn5转座子诱变技术^[10]的应用,对结瘤基因Nod⁺的研究进展很快。日益增多的证据表明:绝大多数快生型根瘤菌的结瘤基因(Nod⁺)被编码于质粒

上^[4-6,8]。根瘤菌结瘤特性的丧失是由于细菌细胞大质粒的消失。用吡啶橙处理能获得不结瘤突变体,且用不同浓度的吡啶橙处理,所得的不结瘤突变率也不同。因而可推论,菌株DI202(Sm^r)的结瘤基因可能位于质粒上,进一步的研究有待于对出发菌株和不结瘤突变体质粒DNA的分离和鉴定。

3. 旋扭山绿豆快生型根瘤菌是作者首次分离的,具有一些特殊的特性^[7]。我们的工作表明,菌株DI202抗热性极强,45 $^{\circ}\text{C}$ 培养能在LMSY平皿上迅速生长,3天形成直径2.5-4mm的菌落。因此,进一步研究旋扭山绿豆快生型根瘤菌的结瘤特性及其遗传学,对菌种的改良及根瘤菌分类学、进化和遗传学等方面的研究,都有理论价值和实际意义。

参 考 文 献

- Higashi A: *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13: 391-403, 1967.
- Zurkowski W: *Mol. Gen. Genet.* 181: 522-524, 1981.
- Beynon J L et al.: *J. Gen. Microbiol.* 120: 421-429, 1980.
- 葛诚: *微生物学通报* 14 (2): 77-80, 1987.
- Date R A: *Exploring the Legume Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture* (J M Vincent, A S Whitney and J Bose ed.) 293-311, University of Hawaii, College Agriculture Miscellaneous Publication 145, 1977.
- 林德球等: *华南师范大学学报(自然科学版)*, 1: 102-106, 1985.
- 林德球: *微生物学报*, 29 (5): 354-359, 1989.
- Graham P H: *Antorice Van Leeuwenhoek*, 30: 68-72, 1964.
- 李仲贤: *微生物学通报*, 12 (4): 151-153, 1985.
- 宁林夫等: *遗传学报*, 13 (1): 1-10, 1986.
- Rolf B G et al.: *Aust. J. Biol. Sci.* 33: 491-504, 1980.

(1992-10-26 收稿)