

紫云英根瘤菌抗药性菌株的获得与初步应用*

湖北省微生物研究所生物固氮组

(武汉)

将根瘤菌培养至对数生长初期,加入药物淘汰,再用含药浓度较高的平板选择,能顺利获得抗药性突变体。经室内及田间试验观察,选出了既有稳定抗药性又保持良好共生固氮能力的抗链霉素菌株 Sm^R52; 抗卡那霉素菌株 Km^R34。

根瘤回收试验结果说明:用含药平板检查根瘤榨汁,可以鉴定根瘤是否由抗药性菌株所形成,为研究老区接菌效果提供了有用的工具。了解到有效根瘤菌株之间在结瘤习性上存在竞争性关系。还发现一个根瘤内可以同时存在两个紫云英根瘤菌株,在本试验条件下这种双重感染的根瘤的比例可达 14—19%。

紫云英根瘤菌(*Rhizobium astragali*)已有十多年的应用历史,近年来,随着农业微生物工作的发展,湖北已有数十个县能就地生产,满足供应。当前有一个老区应用效果问题,即长期连栽紫云英的地区应用紫云英根瘤菌有无效果?怎样才能收到效果?过去对此问题有过一些研究,一般以种子拌菌处理区比不拌菌区增产鲜草来表示效果,未能追踪观察所用根瘤菌的实际结瘤效果。为了弄清这个问题,我们在选育高效菌株的基础上,用抗菌素处理,选出了对链霉素或卡那霉素有稳定抗性,而又保持良好共生固氮能力的紫云英根瘤菌。初步应用这些菌株追踪观察结瘤效果及比较菌株间竞争结瘤能力。具有抗药性标记的有效根瘤菌,对于根瘤菌的生态观察和固氮作用遗传转移的研究都是一个有用的工具。

抗药性菌株的获得

(一) 菌株

出发菌株是新选的共生固氮能力较强的紫云英根瘤菌 F₆、F₁₆、338等。

(二) 培养基

根瘤菌培养基成份(克/升)K₂HPO₄ 0.5; MgSO₄ 0.2; NaCl 0.2; CaCl₂ 0.1; 甘露醇 10.0; 酵母提取物干粉 0.4; 微量元素母液 4 毫升(内含 H₃BO₃ 和 Na₂MoO₄ 各 0.5%)。固体培养基加琼脂 18.0。

无氮植物培养液成份(克/升)K₂HPO₄ 1.0; MgSO₄ 1.0; Ca₃(PO₄)₂ 0.5; NaCl 0.5; FeSO₄ 0.02; H₃BO₃ 0.02; Na₂MoO₄ 0.02; MnSO₄ 0.02。

(三) 抗菌素

链霉素硫酸盐(简称 Sm)华北制药厂出品;卡那霉素硫酸盐(简称 Km)上海第四制药厂出品。

(四) 抗药性突变体的获得

1. 刮取一大环斜面菌种,接到 100 毫升培养液中,28℃ 摇床培养过夜,细菌处于对数生长初期。

2. 按浓度为 100 微克/毫升计算药量,加链霉素或卡那霉素到上述培养物中,摇床继续培养 5—7 天,在此过程中培养液由

本文于 1977 年 3 月 10 日收到。

* 田间试验的工作是与枣阳县生产资料公司菌肥厂、枣阳县张垌大队、咸宁县群力大队农科所、孝感县肖港公社微生物站等协作。

清到混浊,说明抗药性突变体已经出现并繁殖起来。

3. 用含药梯度浓度平板来选择抗药性较强的单菌落,梯度平板的倾斜底层含药浓度为 1000 微克/毫升上层盖以无药培养基。此法挑得的单菌落,其具体的抗药水平尚未确知,有待鉴定。另一方法是,将上述步骤 2. 的混浊培养物,经适当稀释后(一般为 10^{-2} ; 10^{-3}),直接混入含药浓度为

500 或 1000 微克/毫升的培养基,作成混菌平板,培养 5—7 天,抗药能力超过 500 微克/毫升的突变体可长成丰满菌落,挑取单个菌落接到无药斜面中保存。

紫云英根瘤菌野生型菌株对链霉素和卡那霉素的敏感性列于表 1。

(五) 共生固氮能力的再鉴定

国外一些工作者曾提到,根瘤菌在获得抗药性后,菌株的共生固氮能力会降低,

表 1 24个紫云英根瘤菌株对两种抗菌素的敏感性

| 菌 株 号 | 链霉素(微克/毫升) | | | | | 卡那霉素(微克/毫升) | | | |
|-------|------------|----|----|----|-----|-------------|-----|-----|-----|
| | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 | 25 | 50 | 100 | 200 |
| 04 | + | + | - | - | - | ++ | (+) | - | - |
| 5 | + | + | - | - | - | +++ | + | - | - |
| 9 | + | + | - | - | - | ++ | (+) | - | - |
| 25 | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 | + | + | - | - | - | +++ | +++ | + | - |
| 56 | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 85 | + | + | - | - | - | +++ | + | - | - |
| 98 | + | + | - | - | - | +++ | + | - | - |
| 108 | + | + | - | - | - | +++ | + | - | - |
| 141 | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 145 | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 149 | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 151 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 237 | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 335 | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 337 | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 338 | + | + | - | - | - | (+) | - | - | - |
| F6 | + | + | - | - | - | +++ | +++ | + | - |
| F16 | + | + | - | - | - | +++ | +++ | + | - |
| 111 | + | + | - | - | - | +++ | + | - | - |
| A16 | + | + | - | - | - | +++ | +++ | (+) | - |
| 湘23 | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 湘133 | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 湘119 | + | + | - | - | - | - | - | - | - |

注: +++代表生长丰满; +代表能生长; (+)生长很慢; -不生长
方法: 斜面菌种作成 10 毫升悬浮液,每菌株点一环于各种含药平板上,重复一次,28℃ 培养 5—6天记录结果。

甚至丧失有效性。为选出既有稳定抗药性又保持良好共生固氮能力的菌株,就必须对抗药性后代作共生固氮能力的再鉴定。

我们采用灭菌无氮砂培法,容器为直径 12 厘米搪瓷缸,装洗净河砂 1600 克,植物培养液 400 毫升。种子用乙醇、氯化汞消毒,

无菌水洗 10 次, 催芽至根长 0.5 厘米供试验用。发芽种子接触菌悬液 30 分钟后, 植入砂培缸内, 每缸 9—10 苗, 15 天后间苗, 留 5 苗。在防止根瘤菌污染的条件下, 生长 60 天。根据植物地上部叶色、鲜重、干重来判定其共生固氮能力的好坏。用亲株接种的植株作为对照, 收获时, 黄化不结瘤的、只结小白瘤不固氮的和叶色不浓绿、生长势显著差于对照的都淘汰。选取鲜重超过或接近对照的植株, 地上部分烘干称干重, 根系留作根瘤回收鉴定。

(六) 用含药平板鉴定根瘤内根瘤菌

将所选植株的根系样品, 用自来水冲洗干净, 每号共取较大根瘤 50—60 个(每株取 5—6 个)。经乙醇、升汞、无菌水洗涤后, 用镊子逐个由根瘤中挤取汁液, 点于含药为 500 微克/毫升的平板上, (每平板可点 20 个根瘤样品, 每滴根瘤榨汁彼此不能沾连, 镊子用火焰灭菌。) 28℃ 培养 5—6 天观察菌落的生长。抗药性稳定者, 3—4 天长出菌落, 5 天后生长成丰满隆起的菌落。丧失抗药性者不生长, 只留下干了的点样痕迹。

通过砂培观察和根瘤回收鉴定, 选出了抗链霉素的代表菌株 Sm^{R52} , 抗卡那霉素的代表菌株 Km^{R34} 。它们的菌悬液混入含药浓度为 1000—2000 微克/毫升的平板中能长出单菌落。菌株与植物结瘤 60 天后, 根瘤内之根瘤菌仍保持对药物的抗性。即全部根瘤样品在含药平板上都长出菌落。砂培观察的共生固氮效果, 如以亲株接种的植物平均单株干重为 100%, 则 Sm^{R52} 的为 126%, Km^{R34} 接种的为 121%。田间试验的表现亦不差, 参看表 4 的结果。

Sm^{R52} 菌株不抗卡那霉素, Km^{R34} 菌株不抗链霉素。

抗药性菌株的初步应用

(一) 田间观察

1975 年秋, 我们将 Sm^{R52} 和 Km^{R34} 和田间菌株进行了比较, 考查了下列几个方面。

1. 早期结瘤情况: 调查结果列于表 2。不拌菌的试验小区全部植株结瘤, 生长正常, 说明土壤中有紫云英根瘤菌, 但拌菌小区的植株结瘤早些、根瘤普遍多些。

表 2 早期结瘤情况*

| 调查时间 | 60 植株平均单株结瘤数 | | | | |
|---------|--------------|------|------|------------|------------|
| | 不拌菌 | F6 | 338 | Sm^{R52} | Km^{R34} |
| 播后 15 天 | 0.6 | 6.5 | 5.4 | 6.2 | 4.6 |
| 播后 41 天 | 12.3 | 20.9 | 15.4 | 28.8 | 17.6 |

* 地点在枣阳张湾四队 1975 年 9 月 11 日播种, F6、338 为新选高效菌株。

2. 抗药性菌株拌种小区根瘤回收鉴定: 结果列于表 3。在本试验的拌菌量和播种条件下, 所用的抗药性菌株占回收检查的根瘤 90% 左右, 60 天与 180 天两次回收结果, 占瘤比例无明显差别。

表 3 抗药性菌株应用后根瘤回收情况*

| 地点 | Sm^{R52} 拌种区瘤样品 在 Sm^{500} (微克/毫升) 平板上生长数 | | Km^{R34} 拌种区瘤样品 在 Km^{500} (微克/毫升) 平板上生长数 | |
|----|---|-----------------|---|-----------------|
| | 播后 60 天 (%) | 播后 180 天 (%) | 播后 60 天 (%) | 播后 180 天 (%) |
| 枣阳 | 99 | 100 | 79 | 92 |
| 咸宁 | 81 | 100 | 88 | 90 |
| 孝感 | 98 | 91 | 85 | 92 |

* 在同一处理的各小区内随机多点采集 50 株植物, 每植株剪取几个最大的根瘤(因为较大的根瘤易于分离, 也反映出它发生较早, 对于植物生长影响较大)。集合一起表面消毒后, 逐个点样于含药平板。表中每个百分数值是回收 200 个根瘤的结果, 全部试验共检 2400 个根瘤。

3. 紫云英鲜草产量: 1976 年 4 月中, 验收试验田各处理区紫云英鲜草产量, 结果列于表 4。可以看到抗药性菌株在田间的表现不差于亲株。

结果说明, Sm^{R52} 共生固氮能力良好, 抗药性稳定。可用于观察田间结瘤效果。

表 4 紫云英鲜草产量验收结果*

| 地点 | 处理 | 地上部鲜草产量(斤/亩) | | | | |
|----|----|--------------|------|------|--------------------|--------------------|
| | | 不拌菌 | F6 | 338 | Sm ^R 52 | Km ^R 34 |
| 枣阳 | 阳 | 6630 | 7230 | 7400 | 7400 | 7170 |
| | 咸 | 2769 | 3750 | 3880 | 3680 | 3670 |

* 播种方法:一支斜面菌种作成悬浮液拌泡胀种子 5 两(合干种子 3 两),播三个重复小区,每小区面积 0.01 亩,土地耕耙后分成小区,开浅沟条播,播后盖土。验收时三个小区鲜草全部收割过秤。

在本试验条件下,能占所检根瘤 90% 左右。即使在枣阳试验点,不拌菌小区虽有 6600 斤/亩的高产水平,但各拌菌处理区都普遍有 10% 的增产潜力。

(二) 菌株间竞争结瘤观察

Sm^R52 菌株只抗链霉素不抗卡那霉素, Km^R34 菌株只抗卡那霉素不抗链霉素,它们在植株上结瘤后,从根瘤内回收的根瘤菌仍保持原有的抗药性。我们用此两菌株在砂培条件下观察根瘤菌株间的竞争结瘤关系。用斜面菌种作成 10 毫升悬浮液,(未作活菌数定量)按菌悬液体积定量。Sm^R52 与 Km^R34 各 1 毫升混合为一组。第二组为 Sm^R52 1 毫升 + Km^R34 5 毫升。第三组为 Sm^R52 1 毫升 + Km^R34 10 毫升。充分混匀后,浸发芽种子 30 分钟,每组选 20 芽植入砂培缸中,剩余菌液未加到砂培内。生长 60 天后洗出每组试验的根系,剪取较大根瘤约 100 个,经表面灭菌后,将每个根瘤汁液点样于四种平板上。平板设置如下:①无药平板,以检查根瘤内根瘤菌有无被表面灭菌所伤害。②含链霉素 500 微克/毫升的平板,以检查 Sm^R52 菌株的存在。③含卡那霉素 500 微克/毫升的平板,以检查 Km^R34 菌株的存在。④含链霉素和卡那霉素各 500 微克/毫升的平板,以判断有无能抗二种抗生素的杂交后代存在。共检查了 420 个根瘤,结果列于表 5,其中能在无药平板上生长的有 419 个,发现有 73 个根瘤的汁液,既能在含链霉素平板上长

出菌落,又能在卡那霉素平板上长出菌落。但无一能在含两种抗菌素的平板上生长。

表 5 第一批竞争结瘤试验回收情况

| Sm ^R 52 + Km ^R 34 用量(毫升) | 回收根瘤个数(无药平板生长数) | Sm ^R 52 独占根瘤个数(仅在含 Sm 平板上生长) | Km ^R 34 独占根瘤个数(仅在含 Km 平板上生长) | Sm ^R 52 与 Km ^R 34 共存根瘤个数(在 Sm 平板、Km 平板都生长的) |
|--|-----------------|---|---|---|
| 1:1 | 160 | 83(51.8*) | 48(30) | 29(18) |
| 1:5 | 140 | 58(41) | 51(40) | 27(19) |
| 1:10 | 119 | 24(20) | 78(65.5) | 17(14) |
| 合计 | 419 | — | — | 73(17) |

* 括号内为百分率。

结果证明,一个根瘤中可以共存两个菌株。在结瘤方面,菌株间存在竞争性关系。Sm^R52 比 Km^R34 竞争性强些,即 Km^R34 菌株的菌量增加 5 倍和 10 倍时,在根瘤中所占比例并不按此比例增加。不过 Km^R34 在根瘤中所占百分数毕竟还可随接菌量的增加而提高。

表 6 第二批竞争结瘤试验回收情况

| 处理(菌株对) | 无药平板生长数 | Sm 平板生长数 | (Sm ^R 52 占瘤%) |
|--------------------------|---------|----------|--------------------------|
| Sm ^R 52 + F6 | 40 | 11 | 27.5 |
| Sm ^R 52 + 338 | 80 | 55 | 68.7 |
| Sm ^R 52 + 5 | 60 | 43 | 71 |
| Sm ^R 52 + A16 | 40 | 39 | 97 |
| Sm ^R 52 + 111 | 60 | 60 | 100 |

用 Sm^R52 菌株与自然高效菌株一起试验了它们之间的竞争结瘤关系。菌悬液等体积混合,方法同前。结果(见表 6)反映出,根瘤菌株间存在竞争结瘤关系。以占根瘤百分数反映的竞争能力顺次如下: F₆ > Sm^R52 > Km^R34 > 338 > 5、A16、111 等。

讨 论

1. 我们曾用 Schwingamer^[1]的一步法,直接将菌悬液涂布在药物梯度浓度平板上筛选,但结果不理想。后改为现法,就能比较顺利地获得抗药性后代。我们认为,个

体数量足够多和菌体的生理状态较活跃,是筛选处理的关键。

2. 紫云英根瘤菌的抗药性后代,其共生固氮能力是有变化的,有些共生固氮能力下降,有些可结小白色瘤但不固氮、甚至不结瘤,也有抗药性不持久的。所以要获得抗药性稳定且共生固氮能力强的菌株。进行一定的筛选鉴定是必要的。

3. 对于研究老区接菌效果问题,应先着眼于占瘤效果方面。如能使应用的根瘤菌与土壤中原有菌株有所区别,这样才能追踪观察应用菌株的占瘤本领,并用占瘤百分数表示效果。从而可以研究怎样才能达到理想的占瘤比例(如 80—90% 以上)。再在此基础上讨论对植物的增产作用。有较强竞争结瘤性并能保持良好共生固氮作用的抗药性菌株对于研究根瘤菌在老区应用效果,是一个有用的工具。二年来我们用含药平板检查了各地采集的未用抗药性菌株拌种的紫云英根瘤 1000 多个,无一能生长。区别是显著的。所以,应用抗药性菌株拌种和药物平板回收鉴定根瘤的办法,能了解应用菌株在田间的占瘤效果,这为老区接种根瘤菌研究开辟一条途径。

4. 竞争结瘤试验说明,有效根瘤菌株之间,存在竞争结瘤关系。因此,对于生产用菌株除了共生固氮效率高之外,还应具有较强的竞争结瘤性能,才能在老区田间起作用,澳大利亚的 A. H. Gibson^[6]和 R. I. Roughley 等^[7]报道过应用血清学方法追踪菌株在各种土壤中的占瘤效果和存活年限,他们也有类似的想法。

5. Sm^R52 和 Km^R34 的竞争结瘤试验反映出,在 Sm^R52 数量不变的情况下, Km^R34 的占瘤百分数与拌菌量之间存在正相关的联系。这与法国的 Amerger, N.^[12] 所提到的占瘤率与拌菌数的 Log 10 成比例的结论相若。他们的田间试验,最高拌菌量处理

组,可获得占瘤 80% 的效果。我们在 76 年秋季的田间试验中,也反映出占瘤数随拌菌量的增加而增加的倾向。所以,在老区应用效果上是要考虑接菌数量的。因此,菌剂的含菌数今后应予足够的重视。

6. 过去一般认为一个根瘤由一株根瘤菌发育,但最近已提出了在一个根瘤内可含两株根瘤菌的明确的证据,美国 W. C. Lindeman 等人^[3]应用荧光抗体技术和双光系荧光显微镜,在接菌量较高的几个处理中,观察到混合接种后有 32% 大豆根瘤内存在两菌株。A. W. B. Johnston 等^[4]用有缺陷型和抗药性标记的豌豆根瘤菌作混合接种,也观察到 19% (56/297) 的根瘤内含有两个菌株,其中 21 个双菌株感染的根瘤中有 4 个根瘤还出现了杂交后代。我们检查 $\text{Sm}^R52 + \text{Km}^R34$ 混合接种的 419 个根瘤,其中 73 个含有两菌株,约 17%。但尚无抗两种抗菌素的杂种后代出现。我们判断杂交后代的双抗菌素平板浓度是较高的(各为 500 微克/毫升)。这种条件可能过于苛刻,以至于把抗性低的后代排除了。

关于双菌株感染的根瘤内,两者的数量关系有待以后考查。

参 考 资 料

- [1] Schwinghamer, E. A. and Dudman, W. F.: *J. Appl. Bact.*, 36: 263—272, 1973.
- [2] Amerger, N.: *C. R. Acad. Sci. Paris*, 279 (Ser. D): 527—530, 1974.
- [3] Lindemann, W. C. et al.: *Soil Sci.*, 118 (4): 274—276, 1974.
- [4] Johnston, A. W. B. and Beringer, J. E.: *J. Gen. Microbiol.*, 87: 343—350, 1975.
- [5] Labandera, C. A. and Vincent, J. M.: *Pl. Soil*, 42: 327—347, 1975.
- [6] Gibson, A. H. et al.: *Soil Biol. Biochem.*, 8 (5): 395—402, 1976.
- [7] Roughley, R. J. et al.: *ibid.*, 8 (5): 403—408, 1976.

THE ANTIBIOTIC RESISTANT STRAINS OF *RHIZOBIUM ASTRAGALI*: THEIR ACQUISITION AND APPLICATION

Group of Biological Nitrogen Fixation, Hubei Institute of Microbiology
(Wuhan)

Resistant mutants against streptomycin or kanamycin could easily be obtained by adding one antibiotic, in concentration 100 $\mu\text{g/ml}$, to the cultures of *Rhizobium astragali* during logarithmic growth phase and then selecting the mutants by the agar plate containing one antibiotic in high concentration 500—1000 $\mu\text{g/ml}$. Thus we have selected two representative strains Sm^r52, and Km^r34 resistant to streptomycin and kanamycin respectively. Laboratory and field examinations show that their resistance and N₂ fixation ability were well kept for

generations.

By using antibiotic (500 $\mu\text{g/ml}$) agar plate culture plated with nodule squash as inoculum, it is possible to identify whether the nodules were formed by the resistant strain. It provides a useful technique for the study of inoculation effect on the old planting area. Experimental data show that there exists a competitive nodulation among the effective strains, and there are two strains coexisting within one nodule. Under this experimental condition, nodules of duplex infection present up to 14—19%.