

细胞分裂素产生菌——紫云英根瘤菌 1.8 的诱变效果

梁伯璠

(河北大学生物系,保定)

某些微生物在其生长过程中能向环境中分泌细胞分裂素。从六十年代以来,国外就有报道。如 Skoog 等用黑痘病棒状杆菌^[1], Miller 用真菌^[2], Torrey 等用大豆根瘤菌^[3]为材料都进行过实验研究。而在国内至今尚未见到过有关报道。近两年来,我们进行了某些根瘤菌和固氮菌产生细胞分裂素情况的实验,并在此基础上对产生细胞分裂素能力较强的菌株进行了化学诱变,以期选出更好的菌株。

材料和方法

(一) 菌种及来源

1. 大豆根瘤菌 (*Rhizobium japonicum*) 005, 2028, 由中国农科院土肥所提供。1.891, 由中科院微生物所提供。

2. 紫云英根瘤菌 [*Rhizobium* sp. (*Astragalus*)] 1.8, 由中科院微生物所提供。山大 1 号, 来源于山东大学。

3. 褐球固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*) 1.827, 由中科院微生物所提供。

4. 叶际固氮菌 (简称叶际) (*Azotobacter chroococcum*) 2 号, 由河北省科学院微生物所提供。

(二) 培养基和培养条件

1. 斜面培养基: 用根瘤菌、固氮菌常规培养基。

2. 摇瓶培养基: 根瘤菌用化学合成培养基^[3], 固氮菌用阿须贝氏 (Ashby) 培养基。

3. 培养条件: 将提供菌种转至斜面培养基活化, 在 30℃ 下培养 2—3 天, 然后取一环接入装有 100ml 摇瓶培养基的 500ml 三角瓶中, 置于摇床上在 26℃ 下黑暗培养 2 天即成为种子

瓶。然后, 取种子瓶菌液 10ml 加入装有 90ml 摇瓶培养基的 500ml 三角瓶中, 以同样条件摇床培养到菌体生长的稳定期。取下发酵瓶进行菌液的细胞分裂素的提取和纯化。每个菌种发酵液总量为 1000ml。以不接种的摇瓶培养基作对照。

(三) 细胞分裂素的提取和纯化

取下发酵瓶, 将每个菌株的 1000ml 发酵液在 70℃ 下加热一小时, 离心去掉菌体, 转速为 4000r/min, 取上清液减压浓缩至 200ml, 用 1N HCl 酸化至 pH 为 2.5, 经再次离心, 转速为 8000r/min。取上清液用国产 732 强酸性阳离子交换树脂进行柱层析。先用 400ml 重蒸馏水洗柱, 后用 400ml 3N 的 NH₄OH 洗脱, 收集洗脱液并减压浓缩至 15—20ml, 调节 pH 到 8, 用等体积的水所饱和的正丁醇萃取, 留醇相, 水相继续萃取。经三次萃取后弃水相, 合并醇相并减压蒸干, 用 2ml 95% 乙醇洗涤, 即得含有细胞分裂素的乙醇液。用此液进行硅胶 G 薄板层析, 展层剂为正丁醇: 异丙醇: 氨水: 水 = 2:8:1:1, 刮取 R_f 值在 0.6—0.9 区间的硅胶, 用 90% 乙醇提取, 经离心后待上清的乙醇液蒸干, 加入磷酸酪氨酸缓冲液进行细胞分裂素的生物活力测定。

(四) 细胞分裂素的生物活力测定

用尾穗苋 (*Amaranthus candidatus* L.) 黄化苗子叶苋红合成法^[4] (以下简称苋红合成法)。细胞分裂素的提取纯化和活力测定的实验用水及药剂配制均为重蒸馏水。

参加实验工作的还有我系毕业生王小强、孙士侠、杨志强、袁国华、石磊。

(五) 诱变

对紫云英根瘤菌 1.8 进行 30℃ 下摇瓶培养, 得知培养 20 小时已有荚膜生成。我们用生长 15 小时的菌体以 400 μg/ml 亚硝基胍处理 30 分钟进行常规诱变。最后将已诱变的菌液用系列稀释法涂布铺板, 30℃ 下保温培养 48 小时, 挑选单菌落进行划线分离。

(六) 诱变株的初步筛选

将每个诱变株进行摇瓶发酵, 发酵液为 100 ml, 在 30℃ 下黑暗培养 24 小时, 离心去掉菌

体, 上清液用 UV-210A 双光路可见紫外光自动分析仪测其紫外吸收曲线。确定初筛菌株。将初筛菌株进行 1000ml 摇瓶发酵, 经提取纯化后, 最后测其细胞分裂素类物质的生物活力, 以确定诱变效果。

结果和讨论

(一) 不同菌种产生细胞分裂素的能力比较

不同菌种产生细胞分裂素的情况见表 1。

表 1 不同菌种产生细胞分裂素的情况

菌种	005	2028	叶际 2 号	1.891	山大一号	1.827	1.8	对照
尾穗苋子叶变红情况	不变红	不变红	微红	较红	较红	红	最红	不变红
苋红素 A	0	0	0.003	0.0115	0.0125	0.017	0.042	0

从表 1 结果可以看出, 菌种 005、2028 在实验条件下未使尾穗苋黄化苗子叶 (以下简称黄化苗) 变红, 说明没有细胞分裂素产生。叶际 2 号能使黄化苗变红, 说明它能向环境中分泌细胞分裂素, 但量极微。菌种 1.891, 山大 1 号、1.827 都能使黄化苗变红, 也能测出其苋红的光密度值, 但由于量少, 不能从标准曲线上查出其活性数值。在实验中, 以紫云英根瘤菌 1.8 能使黄化苗变得最红, 说明它向环境中分泌细胞分裂素的量较大。在标准曲线上查得的活性数值相当于每升发酵液含有 0.43 μg 6-苄基嘌呤活力的细胞分裂素类物质。可见, 不同菌种和菌株产生细胞分裂素的能力差异甚大。这同国外的有关报道是一致的^[3,4]。有人认为, 根瘤菌之所以刺激植物产生根瘤, 主要是因为它向植物根皮层细胞内分泌了细胞分裂素所致。它们之间的共生关系是一个激素关系^[5]。固氮菌类分泌胞外生长物质, 刺激了作物生长, 是它最终能使作物增产的原因之一^[6]。由于这类微生物有这种分泌细胞分裂素的能力而它们之间又存在着很大差异, 经过筛选或诱变获得高产菌株是有希望的。

(二) 诱变株的初步筛选

从上述结果中看出, 虽然紫云英根瘤菌

1.8 产生细胞分裂素的能力较强。但从总活性量来看还是很少的。因此, 我们以它为原发菌株, 进行了化学诱变。以期得到产生细胞分裂素能力更强的诱变株。各诱变株经发酵后, 测其发酵液的紫外吸收曲线。作为初筛的依据。因为细胞分裂素是一类腺嘌呤衍生物, 它们具有吸收紫外光的特性。嘌呤环一般在 250—280 nm 处有一强烈的吸收峰。因此, 可按嘌呤化合物的鉴定常规来鉴定细胞分裂素^[7]。紫外吸收法简便、迅速、准确, 符合对大量诱变株进行初筛的要求。用此法测出了大量诱变株的紫外吸收曲线图谱(图 1—4)。

从图 1—4 可看到, 各诱变株的紫外吸收曲线差异很大。在这大量的紫外吸收曲线中, 我们选择吸收峰波长在 250—280nm, 而且吸收峰的光密度值又较大的诱变株为初筛株。因为这样的诱变株会有较多的具有紫外吸收特性的物质。结果, 我们选取了诱变株 75、96 和 101 号为初筛菌株。它们的紫外吸收特性见表 2 所列。

从表 2 结果来看, 初筛株 75 号和 96 号分别在 269nm 和 267nm 处有一个紫外吸收峰, 其光密度值都较大。这说明, 在它们的发酵液中含有一类数量较大的具有吸收紫外光特性的物

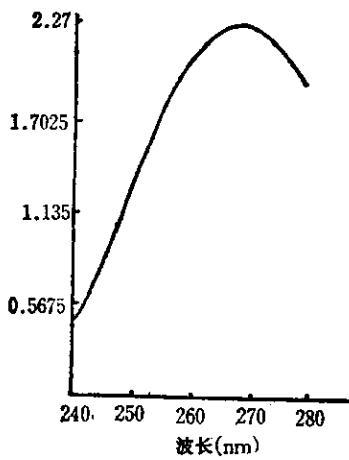


图1 诱变株 75 号的紫外吸收曲线

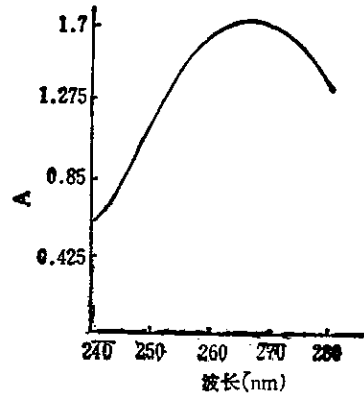


图2 诱变株 96 号紫外吸收曲线

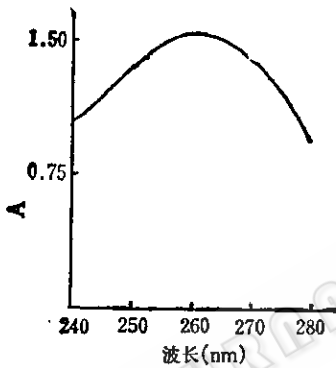


图3 诱变株 101 号紫外吸收曲线

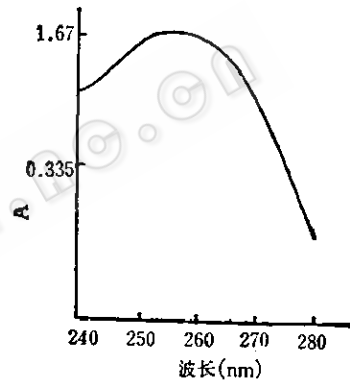


图4 原发菌株紫外吸收曲线

表2 初筛菌株的紫外吸收特性

菌株	吸收峰波长 (nm)	A
原发菌株	256	1.67
75 号	269	2.27
96 号	267	1.70
101 号	258—262	1.50

质。而初筛株 101 号在波长 258—262nm 有一个较宽的吸收峰，这说明在它的发酵液中含有具吸收紫外光特性的物质种类较多。

(三) 对初筛株产生细胞分裂素能力的鉴定

根据初筛株紫外吸收的特点，我们选出了三个初筛菌株。那么，它们所具有的种类较多

表3 初筛株与原发株产生细胞分裂素的活力比较

菌株	原发菌株	96 号	75 号	101 号
尾穗苋子叶变红情况	较红	红	较红	微红
苋红素 A	0.04	0.065	0.034	0.015
相当于激动素活力 ($\mu\text{g/L}$)	0.925	1.537	0.837	因活力低未测出

或数量较大的具有吸收紫外光特性的物质是否就是细胞分裂素，还不能作定论。我们只有将它们的发酵液经过提取纯化细胞分裂素的步骤，用生物鉴定法测其所具有的细胞分裂素的活力才能最后比较初筛株与原发株产生细胞分裂素能力的差异，从而确定诱变的效果。其结果

见表 3 所示。

从表 3 的结果看出, 在三个初筛菌株中, 101 号产生细胞分裂素的能力比原发菌株要差, 75 号则与原发菌株相似。而初筛株 96 号使黄化苗变得最红。说明它产生细胞分裂素的能力最强, 而且明显高于原发菌株。实际测得它的每升发酵液含有相当于 $1.537\mu\text{g}$ 激动素活力的细胞分裂素类物质, 比原发菌株的 $0.925\mu\text{g}$ 提高了 66%。通过这次诱变, 选出了比原发菌株产生细胞分裂素能力更强的 96 号菌株。这说明, 今后进一步采用多种方法, 培育出细胞分裂

素的高产菌株是有希望的。

参 考 文 献

- [1] Klambt, D. Thies, G. and Skoog, F.: *Proc. Nat. Acad. Sci (Wash)*, **56**: 52—59, 1966.
- [2] Miller, C. O. and Crafts, C. B: *Plant Physiol.* **54**: 586—588, 1974.
- [3] Phillips, D. A. and J. G. Torrey, : *Physiol. Plant.* **23**: 1057—1063, 1970.
- [4] Phillips, D. A. and Torrey, J. G.: *Plant Physiol.* **49**: 11—15, 1972.
- [5] 丁静等: 植物生理学通讯, **2**: 27—39, 1979。
- [6] 河北微生物研究所: 微生物学通报, **6**: 1—5, 1979。
- [7] 增田芳雄等: 植物激素, 科学出版社, 237—239, 1979。