

对紫云英根瘤菌突变株的生长情况 及产生细胞分裂素能力的考察

梁伯璠 米贯东 原冀平

(河北大学生物系,保定)

研究报告

摘要 紫云英根瘤菌突变株 96 号,只有增强了原来培养基的缓冲能力并增加了氮源后,才能使其正常生长。96 号突变株产生细胞分裂素的能力随着生长过程的不同而异。它产生细胞分裂素的最大量在菌体生长的稳定初期,为 $15.01 \mu\text{g/L}$,比出发菌株的 $2.18 \mu\text{g/L}$ 提高了近 7 倍。经修改后的根瘤菌常规培养基能用于该菌株的发酵培养,并能正常产生细胞分裂素类物质。在培养液中加入腺嘌呤对菌体合成细胞分裂素类物质有强烈的诱导效应。

关键词 细胞分裂素;突变株;诱导效应

国外的实验已多次证明,某些微生物在生长过程中能向环境中释放细胞分裂素^[1-3]。我们的实验也证明,紫云英根瘤菌 1.8 很明显地有这种能力^[4]。并以它为出发菌株进行了化学诱变,得到了突变株 96 号。它比出发菌株产生细胞分裂素的能力有明显提高^[5]。本实验较详细地考察了 96 号突变株的生长条件及产生细胞分裂素的能力。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

紫云英根瘤菌 [*Rhizobium* sp. (*Astragalus*) 1.8] 的突变株 96 号(以下简称 96 号菌株)来自本实验室。

(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. 发酵培养基:

(1) 原始培养基:包括两种,一是根瘤菌常规斜面培养基去掉琼脂(即常规培养基)。一是化学合成培养基^[6]。

(2) 修改后的培养基:一是将上述常规培养基加入 0.5 g/L NH_4NO_3 。一是将化学合成培养基的 0.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 改为等量的 NH_4NO_3 ,并将 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 的量增大一倍,即由原来的分别为 0.8 g/L 和 0.2 g/L

增加到 1.6 g/L 和 0.4 g/L 。

3. 培养条件:将菌株在 29°C 下斜面培养 2—3 天,取一环接入装有 100 ml (发酵培养基的三角瓶中,置摇床上在 29°C 下培养 17 小时即成种子瓶。再取种子瓶菌液 1 ml 接入装有 100 ml 发酵培养基的三角瓶中,以同样条件进行发酵培养。

(三) 96 号菌株生长情况的考察

将 96 号菌株以原始和修改后的两类培养基进行发酵培养观察菌体生长情况及发酵液 pH 变化。

(四) 96 号菌株产生细胞分裂素能力的考察

1. 以修改后的化学合成培养基进行发酵培养,在不同生长期分别取发酵液 800 ml ,进行细胞分裂素的提纯和活力测定^[6],以观察在不同生长期产生细胞分裂素的能力。

2. 用修改后的常规和化学合成培养基培养菌体,在同一生长期分别取发酵液 800 ml ,经提纯和活力测定,以观察培养基对菌体产生细胞分裂素能力的影响。

3. 在修改后的常规培养基中加入 $2 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ 的腺嘌呤,在稳定期取样 800 ml 与生长同期而不加腺嘌呤的发酵液进行细胞分裂素的活力对比,以观察腺嘌呤对菌体合成细胞分裂素的诱导效应。

(五) 发酵液中细胞分裂素类物质的提取

纯化和活力测定

1. 提取纯化: 将菌株的 800 ml 发酵液在 70℃ 下加热一小时, 离心去掉菌体, 转速为 4000 r/min, 取上清液减压浓缩至 200 ml, 用 1 N HCl 酸化至 pH 为 2.5, 经再次离心, 转速为 8000 r/min。取上清液用国产 732 强酸性阳离子交换树脂进行柱层析。上样后先用 400 ml 重蒸馏水洗柱, 后用 400 ml 3 N 的 NH_4OH 洗脱, 收集洗脱液并减压浓缩至 15—20 ml, 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 2 ml 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。需要说明的是, 一种微生物向环境中分泌的不只是一种细胞分裂素类物质。在进行薄层层析时, 不同种类的细胞分裂素其 R_f 值亦各不相同, 但总的来看其范围基本在 0.6—0.9 区间^[6]。所以, 我们测出并表明菌种产生细胞分裂素的数值代表该菌分泌细胞分裂素类物质的总活力。

2. 活力测定: 用尾穗苋 (*Amaranthus Ca. ndatus* L.) 黄化苗子叶苋红合成法^[6] (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用水均为重蒸馏水。

结果和讨论

(一) 适于 96 号菌株生长的发酵培养基

将 96 号菌株接入原来适于出发菌株生长的培养基上进行培养, 其生长情况见表 1 和图 1。

用修改后的两种培养基进行菌体培养, 其生长情况及生长曲线如表 2 和图 2 所示。

从以上结果可以看出, 96 号菌株在原始的常规和化学合成培养基上分别培养 16 和 17 小

表 1 96 号菌株在原始培养基上的生长情况

培养基类型	培养时间 (h)	菌体生长情况	pH 变化
化学合成	16	培养液浊度不均, 后期出现菌沉	6.7—5.0
常规	17	菌体粘连形成菌块	6.7—6.4

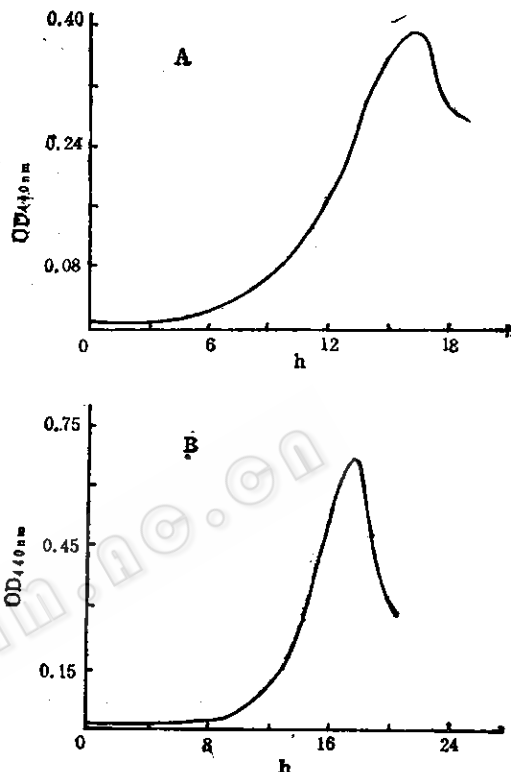


图 1 96 号菌株在原始培养基上的生长曲线

A. 化学合成培养基 B. 常规培养基

表 2 96 号菌株在修改后的培养基上的生长情况

培养基类型	培养时间 (h)	菌体生长情况	pH 变化
修改后化学合成	48	培养液浊度均匀, 无菌沉, 生长正常	7.2—7.0
修改后常规	48	同上	7.2—6.7

时后, 即产生菌体沉淀。其原因在于培养液的 pH 大幅度下降所致。而用修改后的培养基, 由于增加了氮源和缓冲能力, 菌体即能正常生长。图 2 结果表明, 菌体在合成培养基中生长 13 小时就进入对数期, 21 小时达稳定期。在常规培养基中生长更快, 9 小时就进入对数期, 16 小时达稳定期, 48 小时后菌液仍未出现异常现

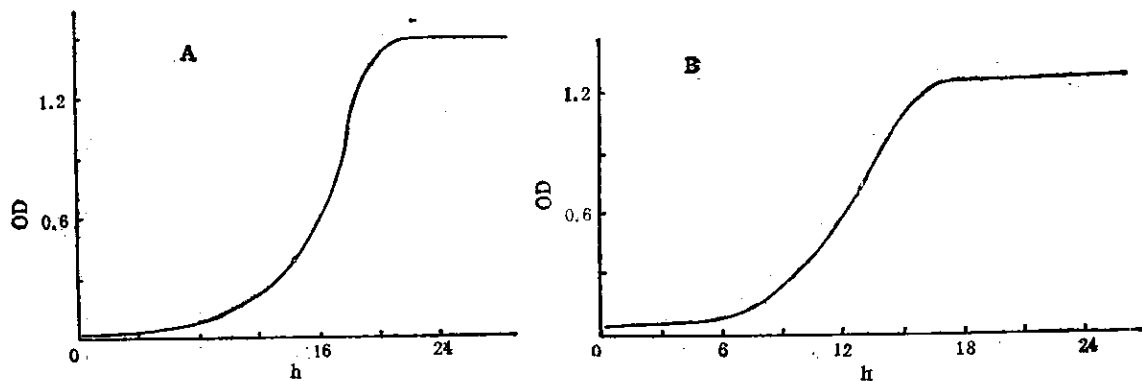


图2 96号菌株在修改后的培养基上的生长曲线
(A) 化学合成培养基 (B) 常规培养基

象。这些结果说明,96号菌株比出发菌株的代谢活动要旺盛的多,这就使得在生长过程中产生大量酸类物质,原来适于出发菌株生长的原始培养基已不适应新菌株生长的需求。当采用修改后的培养基时,由于增加了氮源,增大了培养基的缓冲能力,满足了新菌株生长的需求,它即能正常生长。只有这样,才能进一步考察它产生细胞分裂素的情况。

(二) 96号菌株产生细胞分裂素的能力

1. 不同生长期菌体产生细胞分裂素的情况: 取菌体不同生长期的发酵液,经提纯和活力测定后,观察产生细胞分裂素的情况(表3和图3)。

表3 不同生长期菌株产生细胞分裂素的情况

培养时间(h)	0	16	20	25	30	35
菌体生长时期	—	对数期	对数末期	稳定初期	稳定初期	稳定期
细胞分裂素含量($\mu\text{g/L}$)	0	极微	1.885	6.928	15.014	8.460

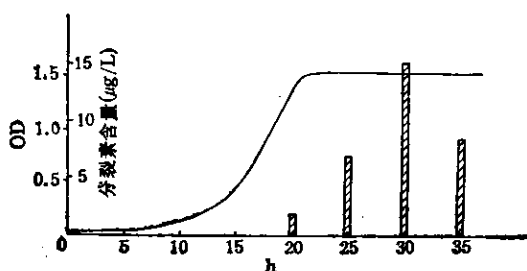


图3 菌株在不同生长期产生的细胞分裂素

表3和图3的结果说明,菌体分泌细胞分裂素的量与其生长情况直接相关。在稳定期之前,随着菌体的生长,培养液中细胞分裂素的量也逐步增加,到稳定期之初达最大量,每升发酵液相当于含激动素 $15.014 \mu\text{g}$ 。到稳定期之后随着菌体生长的停滞,细胞分裂素在培养液中的总量明显减少。说明已释放到培养液中的细胞分裂素是不稳定的,它仍然会被降解。其原因可能是由于酶的作用,是否菌体能分泌某种胞外酶有这样的功能,需进一步探讨。

上述96号菌株随生长期的不同,其细胞分裂素分泌量的变化规律与出发菌株是基本相同的^[4]。但它产生细胞分裂素的能力远远大于出发菌株。即由分泌高峰期的 $2.18 \mu\text{g/L}$ 提高到 $15.014 \mu\text{g/L}$ 。由此可见,96号菌株是一个具有较高产生细胞分裂素能力的新菌株。

2. 不同培养基对96号菌株产生细胞分裂素的影响: Torrey 等为了研究大豆根瘤菌在生长过程中能否向培养液中释放细胞分裂素,应用了化学合成培养基。排除了常规培养基中含有的有机物质和酵母膏等可能会含有微量的细胞分裂素的干扰。但是,化学合成培养基用药品多达21种,而有的用量极微,配制起来非常繁琐。96号菌株已证明能分泌细胞分裂素,是否可改用常规培养基进行发酵培养,这对菌体产生细胞分裂素的特性有无影响,实验结果见表4。

表4的结果说明,用修改后的常规培养基

表4 不同培养基对菌株产生细胞分裂素的作用

培养基	培养时间(h)	细胞分裂素含量 ($\mu\text{g/L}$)
化学合成	20	1.885
	25	6.928
常规	22	2.088

在培养菌体 22 小时之后,发酵液中细胞分裂素的活力介于用化学合成培养基培养 20 至 25 小时之间。说明,改变培养基对 96 号菌株产生细胞分裂素没有明显地影响。常规培养基配制很简便,这给实验工作带来很大方便。

3. 在常规培养基中加入腺嘌呤对 96 号菌株产生细胞分裂素的影响: 根据陶国清对细胞分裂素的代谢研究可知,腺嘌呤是生物合成细胞分裂素的重要底物^[7]。这样,它就有可能作为诱导物来增加合成细胞分裂素的某些酶的量,从而使菌体合成更多的细胞分裂素,实验结果列于表 5。

表5 腺嘌呤对菌体合成细胞分裂素的影响

常规培养基	培养时间(h)	细胞分裂素含量 ($\mu\text{g/L}$)
不加腺嘌呤	22	2.088
加入腺嘌呤	22	25.93

已有实验证明,腺嘌呤不会引起尾穗苋黄

化幼苗在黑暗中合成苋红^[6]。因而可以肯定,在测定培养液中细胞分裂素的活力时,由于加入腺嘌呤而引起苋红合成量的增加,这完全是由于菌体增加了细胞分裂素的合成的缘故。从表 5 的结果可明显地看到,在培养液中加入腺嘌呤之后,大大提高了菌体合成细胞分裂素的能力。在同一生长期取样,由不加入腺嘌呤的每升发酵液相当于 2.088 μg 激动素活力猛增到加入腺嘌呤的 25.93 μg ,提高了近 12 倍。可见腺嘌呤对菌体合成细胞分裂素的诱导效应是非常明显的。

综合以上结果说明,通过菌株的筛选,诱变及其他多种方法,实现细胞分裂素的生物发酵合成是完全可能的。

参 考 文 献

- [1] Klambr. D. Thies G and Skocg 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] 梁伯璠: 河北大学学报(自然科学版), **2**: 75—79, 1985.
- [5] 梁伯璠: 微生物学通报, **6**: 255—258, 1986.
- [6] 丁静等: 植物生理学通讯, **2**: 27—39, 1979.
- [7] 陶国清: 植物生理生化进展, **4**: 74—98, 1986.