

赤霉素的研究

III. 赤霉菌的人工变异和赤霉菌的馴化*

單慰曾 柴明 戴祥鵬 張憲武**

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

赤霉菌象其他应用的微生物一样, 菌种在保存期间, 常有减弱以致丧失其应用上的特性的现象。这种退化现象, 除了与菌种本身的性能有密切关系外, 保存的方法也有很大影响。合适的保存方法可以降低菌种的退化, 不合适则可加速菌种的退化。特别是当赤霉菌連續在人工培养基上移种时, 会在繁殖过程中出现一些赤霉素产生能力較低的后代。而当这些退化的菌体在正常菌株中占有相当比例时, 就会使赤霉素产量降低。但如能淘汰这些退化的菌体, 挑选出赤霉素产生能力較强的菌落, 还可能使产量提高。

要显著提高微生物的效能, 人工变异是比较有效的途径。除了采用物理的刺激外, 化学药剂的刺激也有重要意义。日本学者高桥正寿报导^[1,2], 繼代用鏈霉素处理鏈霉菌, 就能获得高效价的优良菌株。

我們所分离出的赤霉菌菌株的赤霉素效价并不高, 在实验室条件下保存期会出现退化现象; 因而防止菌株的退化和提高菌株的赤霉素产量, 就成为要注意的问题。

一、試驗材料和方法

赤霉菌(*Fusarium* sp.) 22 号是从沈阳近郊和延边一带有恶苗病的水稻植株上分离出的 264 个菌株中筛选出来的。保存期, 部分菌种出现变异, 使赤霉素产量自 100 单位降为 60 单位。将此退化的菌株, 重复用平板分离法进行筛选, 得新菌株 22-A 和 22-B。这 2 个菌株的赤霉素产量都在 100 微克/毫升左右。我們取菌株 22-A 作为放射性 P^{32} 处理的供試菌株; 菌株 22-B 作为赤霉素培育試驗的供試菌株。

进行放射性 P^{32} 的試驗时, 将不同剂量的 $Na_2HP^{32}O_4$ 加入 Raulin-Thom 液体培养基中^[3]后, 高压灭菌, 待培养基冷却, 接入赤霉菌孢子悬液, 振荡培养 5—7 天。进行赤霉菌的馴化試驗时, 将不同剂量經高压灭菌的赤霉素結晶溶液或赤霉素发酵滤液, 调节酸碱度至中性, 加入含有 2% 含米粉的 Raulin-Thom 固体培养基中^[4]。用白金耳移种赤霉菌孢子于此等斜面上, 置温箱中培养 5—7 天。

进行紫外綫照射时, 将赤霉菌孢子悬液傾入錐形瓶中, 加玻璃珠剧烈振荡, 并用滤紙过滤。滤液經显微镜检查系呈单孢子状态, 用无菌水稀释, 使每毫升孢子数約 $1.5—2.0 \times 10^6$ 。取 10 毫升孢子悬液, 注入灭菌的二重皿中, 去盖用紫外綫(捷克制, 波长 2537 Å)分別进行不同時間的照射。照射距离为 29.5 厘米。在照射过程中用玻璃棒不时攪拌。

試驗所用的斜面和平板, 除赤霉素培育所用的固体斜面是以 Raulin-Thom 培养基加入玉米粉和一定量的琼脂为基础培养基外, 都是馬鈴薯琼脂培养基。发酵試驗用的培养基全部是 Raulin-Thom 培养基。

* 本項工作是在 1959—1960 年进行的。

** 参加工作人員还有卢本瓊、唐玉丽、李养福、韓文閣。

本文 1960 年 5 月 29 日收到。

接菌的斜面和平板均在 28°C 的恒温箱中培养。接菌的平板一般培养 3 天菌落就会出现,用白金耳移种子斜面上。接菌的斜面再培养 5—7 天。确定各菌株的赤霉素产量时,是将孢子直接接入盛在 1000 毫升锥形瓶中的 200 毫升发酵培养基内。温度 25—28°C,振荡培养 7 天,用荧光分析法测定赤霉素效价^[4]。

二、試驗結果

1. 放射性 P³² 对引起赤霉菌“22-A”变异的作用

用无菌吸管吸取一定量的赤霉菌“22-A”孢子悬液,分别接入含有放射性 Na₂HP³²O₄ 剂量为 0.1, 0.2, 0.5 和 1.0 微居里/毫升的 Raulin-Thom 培养基中。振荡培养 5—7 天,取出发酵液加入无菌水作成不同稀释度的菌丝体悬液。经玻璃珠振荡均匀,并用粗滤纸过滤;吸取一定量进行平板分离,并检定各菌落的赤霉素产生能力,结果见表 1。

表 1 不同剂量放射性 P³² 对赤霉菌“22-A”孢子产生赤霉素能力的影响

	Na ₂ HP ³² O ₄ 处理剂量 (微居里/毫升)	供试菌株 数(个)	<50(微克/毫升)		50-80(微克/毫升)		80-120(微克/毫升)		120-150(微克/毫升)	
			实数	%	实数	%	实数	%	实数	%
I	0.1	13	1	7.7	7	53.8	4	30.8	1	7.7
	0.2	27	12	44.4	8	29.7	5	18.5	2	7.4
	0.5	36	30	83.3	4	11.1	2	5.6	0	—
	1.0	11	8	72.7	1	9.1	2	18.2	0	—
	对照	27	19	70.4	4	14.8	4	14.8	0	—
II	0.1	48	29	60.4	9	18.8	5	10.4	5	10.4
	0.2	48	35	72.9	8	16.7	5	10.4	0	—
	0.5	42	37	88.1	2	4.8	3	7.1	0	—
	1.0	55	26	47.3	22	40.0	7	12.7	0	—
	对照	42	33	78.7	3	7.1	3	7.1	0	—

试验结果表明,用放射性 P³² 处理赤霉菌孢子,当剂量为 0.1—0.2 微居里/毫升时,可以促使高效价菌落的出现。但当剂量增高时,则此效应反而消失。

2. 赤霉素粗结晶和赤霉素发酵液对提高赤霉菌“22-B”的效价所起的作用

(1) 用赤霉素粗结晶和赤霉素发酵液驯化赤霉菌“22-B”对赤霉素效价的影响

将赤霉素粗结晶和已测知赤霉素效价的发酵滤液进行不同的稀释,分别加入含有 2% 玉米粉的 Raulin-Thom 固体培养基中。赤霉素粗结晶最终浓度为 20、40、60、80、100 微克/毫升,赤霉素发酵液的最终浓度为 24、48、72、96、120 微克/毫升,作成斜面。将赤霉菌“22-B”的孢子移植于此斜面上,置 28°C 温箱中,培养 7 天为“第一代”。为了确定菌株产生赤霉素的能力是否改变,按常法进行发酵试验。同时还取少量孢子重复移植于含有赤霉素粗结晶或发酵滤液的新鲜斜面上,经培养 7 天为“第二代”。同样进行发酵试验确定继代驯化菌株产生赤霉素的能力(图 1)。

按图 1 曲线所示,用不同浓度的赤霉素粗结晶驯化赤霉菌,不能明显提高赤霉素产量,若采用继代的方式,反使赤霉素产量明显地降低。但用不同浓度的赤霉素发酵液来驯化赤霉菌情况就有所不同,特别当浓度为 96—120 微克/毫升时,就能使赤霉素产量显著

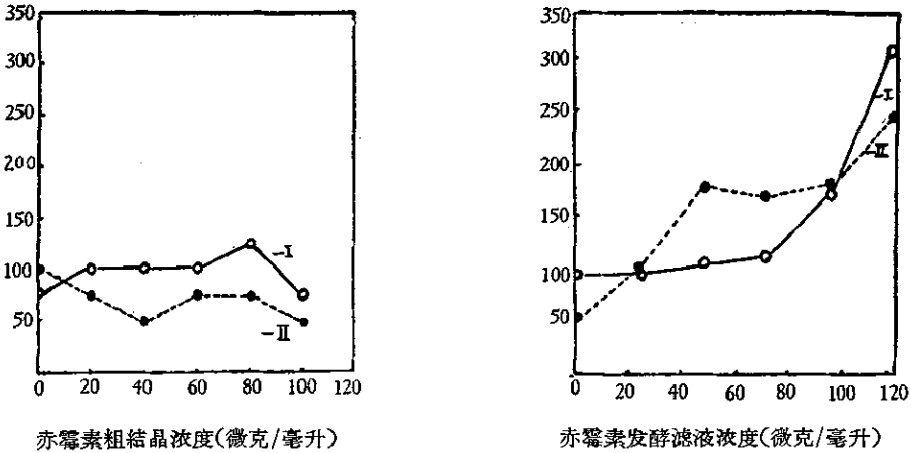


图1 不同浓度的赤霉素粗结晶及赤霉素发酵滤液继代培育对赤霉菌“22-B”产生赤霉素能力的影响 I“第一代” II“第二代”

地提高 86—227%。当继代驯化培养时,由于处理浓度的不同,对赤霉素产量的影响也不一致。关于分别用赤霉素粗结晶和赤霉素发酵滤液处理赤霉菌时获得不相一致的效应的原由,我们初步推测在发酵液中除含有定量的赤霉素外,可能还含有某些对菌株具有刺激作用的物质通过提取结晶的过程被清除掉了。

(2) 用赤霉素发酵滤液驯化赤霉菌“22-B”后的孢子分离试验

由于上述试验,采用浓度为 120 微克/毫升的赤霉素滤液驯化赤霉菌时而显著地提高了赤霉素产量至 305 单位。为了进一步挑选高产量的优良菌株,我们将斜面上的孢子作成悬液,按常法进行平板分离(分离所用的平板不含有赤霉素发酵滤液),挑出单个菌落,并检定各菌落的赤霉素产生能力。结果见表 2¹⁾。

表 2 浓度为 120 微克/毫升的赤霉素发酵滤液驯化赤霉菌“22-B”后的孢子的效价分布

	供试菌落数 (个)	< 100 (微克/毫升)	100—150 (微克/毫升)	150—200 (微克/毫升)	200—250 (微克/毫升)	250—300 (微克/毫升)	300—375 (微克/毫升)
处 理	27	8	4	5	4	2	4
对 照	22	19	2	1	0	0	0

从表中所列数字来看,于固体培养基中加入浓度合适的赤霉素发酵滤液,就可以获得高产量的菌株。然而,值得指出的是当这些菌株在不含赤霉素发酵滤液的斜面上重复移植的过程中,出现的赤霉素产量却很不稳定。因此,如何稳定这些高效价的菌株,就成为十分重要的问题。

3. 紫外线照射和赤霉素粗结晶培育合并应用对赤霉菌“22-B”的变异作用

微生物的遗传性可以通过紫外线的照射而得到动摇,当微生物发生变异的时刻,采用不同浓度的赤霉素溶液来进行驯化,就更有可能获得高效价而稳定的变种。按高桥正寿采用链霉素驯化和紫外线照射的联合处理所获得的链霉菌变种,不仅效价显著增高而且也较稳定。

1) 本工作由我所新技术组段俊英,王桂芝二同志进行。

我們按照前述操作制备成赤霉菌“22-B”的孢子悬液,以紫外綫照射 1、3、4 分钟;經照射的孢子分別在含 10、50、100 微克/毫升赤霉素粗結晶的馬鈴薯琼脂平板上培养,將平板上出現的菌落分別移植于含赤霉素粗結晶的斜面上,最后进行发酵試驗,比較其效价(表 3)。

表 3 不同紫外綫照射时间和不同濃度赤霉素培育联合处理对赤霉菌“22-B”孢子產生赤霉素能力的影响

照射時間 (分)	赤霉素处理浓度 (微克/毫升)	供試菌落数 (个)	< 50 (微克/毫升)	50—100 (微克/毫升)	100—150 (微克/毫升)	250—300 (微克/毫升)
1	10	33	23	10	0	0
	50	14	12	2	0	0
	100	—	—	—	—	—
	0	33	24	5	4	0
3	10	22	21	1	0	0
	50	25	10	11	4	0
	100	15	13	2	0	0
	0	26	24	1	1	0
4	10	28	19	6	3	0
	50	32	7	17	6	2
	100	17	13	3	1	0
	0	24	21	2	1	0
0	10	27	24	3	0	0
	50	29	21	8	0	0
	100	28	24	4	0	0
	0	30	25	5	0	0

表 3 說明,采用紫外綫照射和赤霉素馴化的联合处理在个别情况下,可以获得高效价的变种。但在大多数情况下,未发现有更为良好的效应。然而这些获得的变种的赤霉素效价基本上是稳定的。在联合处理的过程中,若將赤霉素粗結晶改用赤霉素发酵滤液,是否可以提高效率是值得繼續試驗的。

三、討 論

利用放射性 P^{32} 来进行赤霉菌的人工变异,所获得的优良变种,其效价比未处理者提高 30—50%。采用赤霉素馴化的方式来提高菌株的效价,虽然可以比原始菌株提高 1—2 倍,可惜效价不稳定。但若采用紫外綫照射和赤霉素馴化的联合处理,当处理条件合适时,所获得的变种,其效价可以比单独采用紫外綫照射时增高一倍左右,而且也較稳定。为了要通过人工变异获得高效价的变种,采用紫外綫和赤霉素馴化的联合处理,将是有效的一种方法。在实践上和理論上是很有意义的問題,值得菌种选育工作者重視并繼續深入研究;如在联合处理时馴化和紫外綫照射的先后次序,以及它們的繼代次数等問題。同时也应该提到,用赤霉素馴化赤霉菌时,刺激效应的大小,高效价菌落出現的数量和质量,在极大程度上决定于供試菌株原有的生理特性。

四、小 结

1. 分别用剂量为 0.1、0.2、0.5 和 1.0 微居里/毫升的 $\text{Na}_2\text{HP}^{32}\text{O}_4$ 在 Raulin-Thom 液体培养基中处理赤霉菌孢子, 当浓度为 0.1—0.2 微居里/毫升, 可以促使较高产量菌落的出现, 效价比对照增高 30—50%。

2. 用含浓度为 20、40、60、80、100 微克/毫升赤霉素粗结晶的培养基继代驯化赤霉菌, 不能使赤霉素产量有所提高。当用浓度为 120 微克/毫升的赤霉素发酵滤液驯化赤霉菌, 可以显著提高赤霉素产量; 经平板分离获得赤霉菌菌落, 其效价是 375 微克/毫升, 为对照的 2—3 倍。但是, 在不含赤霉素发酵滤液的斜面上重复移植, 效价却不很稳定。

3. 采用紫外线照射和赤霉素驯化的联合方式, 可以提高赤霉菌的效价。经紫外线照射 4 分钟再用含 50 微克/毫升赤霉素的培养基培育所获得的变种, 其效价比单独采用紫外线处理时增高一倍, 而且比较稳定。

参 考 文 献

- [1] 高桥正寿: *J. Antibiotics Ser. B.* 6: 182—191, 1953。
 [2] 高桥正寿: *J. Antibiotics Ser. B.* 6: 192—198, 1953。
 [3] Borrow A and Brain P. W.: *J. Sci. food Agric.*, 6: 340—348, 1955。
 [4] 单慰曾、柴明、戴祥鹏、张宪武: *微生物*, 2: 256—261, 1960。

О ИЗУЧЕНИИ ГИББЕРЕЛЛИНОВ

III. ИСКУССТВЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ И ЗАКАЛИВАНИЕ *Fusarium* sp.

Шань Вэй-цзэн, Чай Минь, Дай Сян-пэн, Чжан Сянь-у

(Институт леса и почвы АН КНР, Мукден)

1. В питательной среде Раулина-тома обрабатываются споры *Fusarium* sp. № 22-A в дозах 0.1, 0.2, 0.5 и 1.0 γ /мл $\text{Na}_2\text{HP}^{32}\text{O}_4$, и при концентрации 0.1—0.2 γ /мл появляются колонии, продуктивность которых повышается на 30—50% по сравнению с контролем.

2. Непрерывное закаливание *Fusarium* sp. № 22-B питательными средами с концентрациями 20, 40, 60, 80, 100 γ /мл неочищенных кристаллов гиббереллинов не повышает их продуктивности, а при закаливании *Fusarium* sp. № 22-B фильтратом брожения гиббереллинов концентрацией 120 γ /мл значительно повышается продуктивность гиббереллинов. Потенция *Fusarium* sp., полученного методом пластинки, составляет 375 γ /мл и она повышается в 2—3 раза по сравнению с контролем. Однако при пересевах на плотной среде без бродильного фильтрата гибберелина их потенция оказалась неустойчивой.

3. Сочетание двух методов—облучения ультрафиолетовыми лучами и закаливания гиббереллинами—позволяет резко повысить потенцию *Fusarium* sp. № 22-B. Потенция варианта, полученного после облучения ультрафиолетовыми лучами в течение 4 мин. и закаливания питательной средой с концентрацией 50 γ /мл гиббереллинов, в 2 раза превышает потенцию варианта, полученного только обработкой ультрафиолетовыми лучами.