

秦岭链霉菌的原生质体再生与诱变育种

卞小莹 吴文君* 王群利 方丽萍

(西北农林科技大学农药研究所 杨凌 712100)

摘要: 在秦岭链霉菌(*Streptomyces qinlingensis* sp. nov.)的菌种改良中,应用原生质体再生并结合物理化学诱变能够得到产量较高、稳定性较好的菌株。筛选实验表明:秦岭链霉菌原生质体再生菌株 R-72、诱变菌株 NTG-1 和 H30-7 对枯草芽孢杆菌的抗菌活性均提高了 20%以上,并且连续培养 10 代,其遗传性状均比较稳定。进一步的生测实验表明菌株 R-72、NTG-1 和 H30-7 对 5 种病原细菌和 5 种植物病原真菌的抗菌活性相比原始菌株有显著提高。

关键词: 秦岭链霉菌, 原生质体再生, 原生质体诱变, 筛选

Protoplast Regeneration and Mutagenesis Breeding of *Streptomyces qinlingensis* sp. nov.

BIAN Xiao-Ying WU Wen-Jun* WANG Qun-Li FANG Li-Ping

(Institute of Pesticide Science, Northwest A & F University, Yangling 712100)

Abstract: To improve the antibiotics production of *Streptomyces qinlingensis* sp. nov., protoplast regeneration combined with physical and chemical mutagenesis was used to selected high-yielding strains. The results showed that the antibacterial activities of strain R-72 from protoplast regeneration and NTG-1, H30-7 from protoplast mutagenesis against *Bacillus subtilis* were more than 20% higher than that of the original strain, and the heredity characters of those strains were stable in successive ten generations. The further bioassay experiments exhibited that the fungicidal and antibacterial activities of the fermentation broth from R-72, NTG-1 and H30-7 were remarkable increased comparing with that of the starting strain.

Keywords: *Streptomyces qinlingensis* sp. nov., Protoplast regeneration, Protoplast mutagenesis, Screening

农用抗生素产生菌秦岭链霉菌(*Streptomyces qinlingensis* sp. nov.)是西北农林科技大学农药研究所从陕西秦岭山区土壤中分离到的一新种放线菌^[1]。前期研究表明其发酵产物对多种植物病原真菌和细菌具有强烈的抑制作用^[2],同时对小菜蛾(*Plutella xylostella* L.)也表现出一定的杀虫活性^[3]。姬志勤等从秦岭链霉菌发酵产物中分离到 10 种抑

菌活性成分,经结构鉴定均为链丝菌素类抗生素,其中 7 种为新链丝菌素类抗生素^[4,5],此外还分离到了杀虫抗生素阿维菌素 B1a、B2a 和 A1a 组分^[3]。同其他农用抗生素产生菌一样,其发酵产物中生物活性物质的含量低,限制了对它的进一步研究和利用^[6]。为了提高其生物活性和有效成分含量,龙建友等对该菌株的孢子进行紫外线、化学试剂、微波及

超声波诱变, 得到一株抗菌活性提高 31.75% 的菌株^[7]。原生质体由于没有细胞壁, 可能对诱变因素更加敏感, 直接对原生质体进行诱变处理, 有可能得到活性有较大提高的菌株^[8]。本研究拟将秦岭链霉菌原生质体的再生与诱变育种相结合, 以提高该菌株的抗菌活性和发酵产物中活性成分的含量。

1 材料和方法

1.1 菌种

出发菌株: 秦岭链霉菌(*Streptomyces qinlingensis* sp. nov.)由西北农林科技大学农药研究所提供。

供试菌: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)购于中国普通微生物菌种保藏管理中心。小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、棉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)和玉米弯孢病菌(*Curvularia lunata*)由西北农林科技大学农药研究所提供。

1.2 培养基和溶液

高氏合成一号、牛肉膏蛋白胨培养基和PDA培养基参考文献[9], 菌丝培养基、P溶液和微量元素溶液参考文献[10], 再生培养基R₂YE参考文献[11], 发酵培养基参考文献[1]。

溶菌酶溶液: 用P溶液配制4 mg/mL的溶菌酶溶液, 微孔滤膜过滤。

1.3 试剂

溶菌酶(Sanland-chem); 蛋白胨、牛肉膏和酸水解酪氨酸, 购自北京奥博星公司。

1.4 方法

1.4.1 菌丝体培养: 将0.2 mL出发菌株的孢子悬浮液接种于装有50 mL菌丝培养基的250 mL的摇瓶中, 28、170 r/min振荡培养48 h, 然后以10%的接种量转接到添加了0.2%甘氨酸的新鲜培养基中继续培养24 h。

1.4.2 原生质体制备: 将培养好的菌丝体3000 r/min离心15 min, 弃去上清液, 先用0.3 mol/L蔗糖溶液洗涤2次, 再用P溶液洗涤, 菌体复悬于P溶液中。然后加入4 mg/mL溶菌酶溶液, 32℃水浴保温60 min, 每隔15 min用无菌滴管轻吹吸1次。然后

用4层擦镜纸滤去未酶解的菌丝体, 3000 r/min离心15 min, 沉淀用P溶液洗涤、离心2次, 即得到原生质体悬液, 稀释备用。

1.4.3 原生质体再生: 取0.1 mL原生质体悬浮液均匀涂布于再生培养基, 28℃培养5 d~7 d。

1.4.4 原生质体紫外线诱变: 将涂匀原生质体的再生培养基平板, 置于15W紫外灯下, 距离30 cm, 分别照射30 s、60 s、120 s、150 s和180 s, 28℃培养5 d。

1.4.5 原生质体亚硝基胍平板诱变: 在涂匀原生质体的再生培养基平板稍靠边的一个位点上放少许亚硝基胍(NTG)结晶, 28℃培养5 d^[9]。

1.4.6 原生质体热诱变: 将装有原生质体悬浮液的离心管置于60℃水浴中, 每隔15 min取出0.1 mL涂再生平板。

1.4.7 琼脂块法初筛: 再生菌株挑出转接到装有15 mL高氏培养基的培养皿平板上, 28℃培养4 d, 用打孔器将菌落连同培养基打成圆柱体, 置于含有枯草芽孢杆菌的培养基上, 4℃保存4 h后, 32℃培养16 h~18 h, 测量抑菌圈的直径, 重复3次。

1.4.8 摇瓶发酵管碟法复筛: 将初筛出的抑菌活性提高的菌株接入装有50 mL发酵培养基的250 mL的三角瓶中, 28、170 r/min摇瓶发酵96 h。采用管碟法测定菌株发酵产物对枯草芽孢杆菌的抑菌圈^[7]和相对效价^[12]。

1.4.9 抗真菌活性测定: 抑制菌丝生长速率法^[13]。

1.4.10 抗细菌活性测定: 管碟法^[6,8]。

1.4.11 菌株遗传稳定性测定: 将连续培养10代的菌株接入高氏合成一号培养基中, 28℃培养4 d后, 170 r/min摇瓶发酵96 h, 管碟法测定其发酵产物抗枯草芽孢杆菌活性^[7]。

2 结果与分析

2.1 秦岭链霉菌原生质体形成率和再生率

秦岭链霉菌菌丝体用4 mg/mL的溶菌酶液32℃酶解60 min, 原生质体形成数约为 2.0×10^5 个/mL, 再生率约为5.12%。

2.2 秦岭链霉菌原生质体再生育种

秦岭链霉菌原生质体在再生培养基上28℃培养5 d, 挑出134株再生菌株, 琼脂块法测定其抗细菌活性, 抗菌活性提高(正突变)的有43株, 占32.09%;

负突变有 77 株, 占 57.46%。挑选正突变菌株进行摇瓶发酵实验, 其抗菌活性结果见表 1 中 R 系列。从表 1 可以看出 R-72 菌株的相对效价最高达到 121.4, 相对效价提高 21.4%。

表 1 再生和诱变菌株发酵产物的抗枯草芽孢杆菌活性			
Table 1 Antibacterial activities of fermentation broth of protoplast regeneration and mutagenesis strains against <i>B. subtilis</i>			
菌株 Strain	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	相对效价 Relative titers (%)	效价提高 Increase of titers (%)
秦岭链霉菌	28.0	100	—
R-22	31.0	110.7	10.7
R-34	32.5	116.1	16.1
R-72	34.0	121.4	21.4
R-73	32.0	114.3	14.3
R-102	32.0	114.3	14.3
R-114	33.0	117.9	17.9
R-134	32.0	114.3	14.3
UV 60-11	31.0	110.7	10.7
UV 150-1	33.0	117.9	17.9
UV 180-1	31.5	112.5	12.5
UV180-2	32.0	114.3	14.3
NTG-1	33.7	120.4	20.4
NTG-2	32.0	114.3	14.3
NTG-7	34.5	123.2	23.2
H30-2	32.5	116.1	16.1
H30-7	34.0	121.4	21.4
H60	31.0	110.7	10.7

2.3 秦岭链霉菌原生质体紫外线诱变结果

秦岭链霉菌原生质体经不同紫外线诱变时间处理, 初筛和复筛后, 得到抗菌活性提高较大的菌株

有 4 株(见表 1 的 UV 系列), 其中经紫外线处理 150 s 后的原生质体再生菌株 150-1 的相对效价最大为 117.9。另外, 与直接用秦岭链霉菌孢子紫外诱变^[7]相比较, 原生质体的紫外线诱变的正突变率要好于对其孢子的诱变效果, 并且活性提高也较大。

2.4 秦岭链霉菌原生质体的亚硝基胍诱变结果

亚硝基胍晶体周围将出现抑菌圈, 挑取紧靠抑菌圈的菌落于高氏平板中, 28℃培养 4 d, 摇瓶发酵管碟法测定其抗细菌活性, 筛选到 3 株菌的抗细菌活性有较大的提高(见表 1 中的 NTG 系列), 有 2 株菌的相对效价均在 120 以上, 其中 NTG-7 的抑菌圈为 34.5 mm, 相对效价提高 23.2%。

2.5 秦岭链霉菌原生质体的热处理结果

秦岭链霉菌原生质体经热处理后筛选出 3 株菌的抗细菌活性有较大提高(见表 1 的 H 系列), 其中 H30-7 菌株的效价提高最大达到 21.4%。

2.6 高效价菌株的遗传稳定性

对 4 株效价提高 20% 以上的菌株进行了遗传稳定性测定实验, 结果见表 2。从表 2 可以看出转接 10 代后菌株 R-72, NTG-1 和 H30-7 的抗细菌活性与传代前菌株相比无显著差异, 相对效价分别为 97.1、96.4 和 94.1, 表明这 3 株菌的遗传稳定性较好。而菌株 NTG-7 经过 10 代遗传后抑菌圈直径降低了 5.5 mm, 相对效价仅为 84.1, 遗传稳定性较差。

2.7 菌株 R-72, NTG-1 和 H30-7 与秦岭链霉菌的抗细菌活性比较

采用管碟法测试了 R-72, NTG-1 和 H30-7 菌株对 5 种细菌的抑制作用(表 3)。由表 3 可以看出 3 株菌对枯草芽孢杆菌的效价均提高 20% 以上, 分别达到 21.4%、20.4% 和 21.4%。另外, 菌株 R-72 对铜绿假单胞菌和大肠杆菌的效价提高 20% 以上, 菌株 NTG-1 对大肠杆菌的效价提高 23.1%, H30-7 对铜绿假单胞菌的效价也提高 23.0%, 这说明该 3 株菌的抗革兰氏阴性菌的活性提高较大。

表 2 4 株高效价菌株的遗传稳定性测定										
Table 2 Hereditary stability of 4 strains with high titers										
菌株编号 Strain	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)									
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
秦岭链霉菌	28.0	28.0	28.0	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5	27.0	27.0
R-72	34.0	34.0	34.0	33.7	33.7	33.5	33.5	33.5	33.3	33.0
NTG-1	33.7	33.7	33.5	33.5	33.5	33.5	33.5	33.5	33.0	32.5
NTG-7	34.5	33.0	33.0	33.0	32.5	32.5	31.0	31.0	30.0	29.0
H30-7	34.0	34.0	33.5	33.5	33.5	33.5	33.5	32.5	32.5	32.0

表 3 菌株 R-72、NTG-1、H30-7 与秦岭链霉菌抗 5 种细菌活性的比较
Table 3 Comparison of antibacterial activities of R-72, NTG-1, H30-7 to *S. qinlingensis*

供试细菌 Bacteria tested	秦岭链霉菌		R-72		NTG-1		H30-7	
	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	效价提高 Increase of titers (%)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	效价提高 Increase of titers (%)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	效价提高 Increase of titers (%)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	效价提高 Increase of titers (%)
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	28.0	—	34	21.4	33.7	20.4	34	21.4
蜡状芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	22.0	—	26	18.2	25.3	15.0	26.3	119.5
金黄葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	15.3	—	18	17.6	18.3	19.6	17.7	115.7
铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	23.0	—	28	21.7	27.3	18.7	28.3	23.0
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	16.0	—	19.3	20.6	19.7	23.1	18.7	16.9

表 4 菌株 R-72、NTG-1、H30-7 与秦岭链霉菌抗 5 种植物病原真菌活性比较
Table 4 Comparison of fungicidal activities of R-72, NTG-1, H30-7 to *S. qinlingensis*

病原真菌 Pathogenic fungi	菌株 Strain	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 R	EC ₅₀ (mL/L)	相对毒力 Relative toxicity
小麦赤霉病菌 <i>G. zeae</i>	秦岭链霉菌	$y=3.9933+1.2477x$	0.9835	6.4103	1.00
	R-72	$y=4.6756+0.9242x$	0.8914	2.2440	2.86
	H30-7	$y=4.8337+0.8060x$	0.8312	1.6028	4.00
	NTG-1	$y=4.6043+0.9014x$	0.8381	2.7479	2.33
苹果炭疽病菌 <i>C. gloeosporioides</i>	秦岭链霉菌	$y=3.2872+0.9837x$	0.9957	55.0965	1.00
	R-72	$y=3.2045+1.1002x$	0.9925	42.8463	1.29
	H30-7	$y=3.2389+1.18807x$	0.9586	30.3663	1.81
	NTG-1	$y=3.1752+1.1940x$	0.9339	33.7471	1.63
番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	秦岭链霉菌	$y=3.4326+1.0378x$	0.9887	32.3846	1.00
	R-72	$y=3.6931+0.9290x$	0.9617	25.5161	1.27
	H30-7	$y=3.6286+1.0371x$	0.9848	21.0083	1.54
	NTG-1	$y=3.5604+1.0208x$	0.9808	25.7242	1.26
棉枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	秦岭链霉菌	$y=4.4451+0.6802x$	0.9863	6.5439	1.00
	R-72	$y=4.6279+0.6252x$	0.9710	3.9362	1.66
	H30-7	$y=4.5991+0.7366x$	0.9963	3.5015	1.87
	NTG-1	$y=4.9421+0.6463x$	0.9989	4.687	1.4
玉米弯孢病菌 <i>C. lunata</i>	秦岭链霉菌	$y=3.9555+0.6604x$	0.9779	38.1557	1.00
	R-72	$y=4.0368+0.6576x$	0.9960	29.1471	1.31
	H30-7	$y=3.7340+0.9053x$	0.9922	25.0288	1.52
	NTG-1	$y=4.9421+0.7323x$	0.9432	28.6905	1.33

2.8 菌株 R-72、NTG-1 和 H30-7 与秦岭链霉菌的抗真菌活性比较

采用抑制菌丝生长速率法测定了菌株 R-72、NTG-1 和 H30-7 对 5 种植物病原真菌的抑菌活性(表 4)。从表 4 中可以看出这 3 株菌对小麦赤霉病菌、

苹果炭疽病菌、番茄灰霉病菌、棉枯萎病菌和玉米弯孢病菌的毒力均有不同程度的提高。其中菌株 H30-7 对这 5 种植物病原真菌的毒力提高最大, 分别是出发菌株的 4.00、1.81、1.54、1.87 和 1.52 倍。另外, 这 3 株菌对小麦赤霉病菌的毒力均有较大的

提高, 分别是出发菌株的 2.86、2.33 和 4.00 倍, 这可能是由于原生质体的再生与诱变使菌株的发酵产物有一定的变化, 对小麦赤霉菌更加敏感。

3 讨论

由于秦岭链霉菌发酵产物中抗菌活性成分有多种^[5], 因此本研究采用生物测定的方法来评价其诱变效果, 即在同等条件下, 以抑菌圈相对大小(相对效价)来评价诱变效果。这种方法简单可行并且比较直观, 尤其是在抗生素菌株选育的初期不失为一种较好的方法^[7]。

原生质体再生菌株 R-72, 其抗菌活性有较大提高, 且传代稳定。Ikeda 等也应用原生质体再生使 *Streptomyces ambofaciens* KA-1028 产生螺旋霉素的能力提高了 1 倍, 使 *Streptomyces fradiae* KA-407 产生泰乐霉素的能力提高了 2 倍^[14]。原生质体再生可以作为一种有效的菌种选育手段。这可能是由于: (1)细胞壁的脱去与再生使细胞壁通透性发生了变化, 从而更有利于抗生素的分泌与体外积累^[15]; (2)原生质体的形成和再生也是一个筛选过程, 只有代谢旺盛的细胞才能再生并形成菌落, 通过筛选获得了生物特性好, 产量高的菌株^[15]。(3)原生质体的细胞质能敏感地接受外界刺激, 引起细胞内一系列化学反应, 造成菌株遗传性的改变, 例如一些参与抗生素生物合成的相关基因的表达或抑制, 使产抗生素能力提高^[16]。

原生质体对诱变剂的敏感性高于孢子, 产量变化幅度往往也高于孢子诱变^[17]。本实验也证明了这一点, 秦岭链霉菌原生质体经紫外线诱变处理后其正突变率和相对效价均好于直接用紫外线处理孢子的正突变率和相对效价, 亚硝基胍诱变处理后的相对效价也要好于孢子诱变效果^[7]。另外, 从秦岭链霉菌原生质体亚硝基胍诱变和热处理的菌株中, 筛选到 2 株抗菌活性有显著提高的菌株 NTG-1 和 H30-7。综上所述, 将原生质体再生和诱变育种相结合是一种改良秦岭链霉菌的可行方法。

参考文献

[1] 龙建友. 秦岭链霉菌开发利用的前期基础研究. 陕西杨

凌: 西北农林科技大学博士论文, 2006, pp.28-44.

- [2] 龙建友, 姬志勤, 师宝君, 等. 一株抗生素产生菌 No.24 菌株发酵液抗菌谱及稳定性测定研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(增刊): 61-64.
- [3] 姬志勤, 张继文, 魏少鹏, 等. 秦岭链霉菌发酵液中杀虫活性成分分离及结构鉴定. 农药学报, 2007, 9(1): 25-28.
- [4] Ji ZQ, Wang MA, Zhang JW, et al. Two new members of streptothricin class antibiotic from *Streptomyces qinlingensis* sp.nov. *J Antibiot*, 2007, 60(12): 739-744.
- [5] 姬志勤. 秦岭链霉菌次生代谢物中生物活性成分研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学博士论文, 2007, pp.52-79.
- [6] 余 卿. 抗菌素的菌株选育. 微生物学杂志, 1987, 7(2): 75-83.
- [7] 龙建友, 吴文君. 农用抗生素产生菌 No.24 菌株诱变选育研究. 西北农业学报, 2005, 14 (1): 98-101.
- [8] 梁蓉芳. 龟裂链霉菌原生质体诱变育种的研究. 微生物研究与应用, 1991, (1): 28-32.
- [9] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1999, pp.124-222.
- [10] Hopwood DA, Wright HM. Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Gen Genet*, 1978, 162: 307-317.
- [11] 李祥锴, 安志东, 朱 非. 林肯链霉菌双亲灭活原生质体融合的研究. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(4): 24-27.
- [12] 代 鹏, 徐雪莲, 贺玉平, 等. 多杀菌素生产菌株发酵配方及条件的优化. 华中农业大学学报, 2006, 25(3): 245-248.
- [13] 慕立义. 植物化学保护研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1991, pp.79-81.
- [14] Ikeda H, Inoue M, Omura S. Improvement of macrobide antibiotic-producing *Streptomyces* strains by the regeneration of protoplast. *J Antibiot*, 1983, 36: 283-288.
- [15] 陈春福, 柯永忠, 罗 朗, 等. 棒状链霉菌原生质体再生和克拉维酸产量变化的研究. 中国抗生素杂志, 1996, 21(2): 94-98.
- [16] 孙 益, 姚 瑜, 董 敏, 等. 柱晶白霉素的诱变育种和发酵研究. 中国抗生素杂志, 1994, 19: 174-177.
- [17] 朱林东, 金志华. 普那霉素产生菌的原生质体诱变育种. 中国抗生素杂志, 2006, 31(10): 591-595.