

农抗5102产生菌原生质体融合育种的研究

Ⅱ. 融合子的遗传分析

梁蓉芳 周 启

(华中农业大学土化系农抗研究室, 武汉)

本文报道了用聚乙二醇(PEG)方法, 将农抗5102产生菌的两株不同营养缺陷型突变体 WNF-2-1-135 ($\text{arg}^- \text{leu}^+$) 的原生质体和 WNF-2-1-90 ($\text{leu}^- \text{arg}^+$) 的原生质体进行融合, 在再生培养基上再生细胞壁并获得稳定的原养型融合子。经测定, 其中三个融合子 (FR-001, FR-005和FR-008) 在营养特性、菌体形态和培养特征等方面与两个亲本都有一定差别; 在抗菌活性方面, FR-001菌株和FR-005菌株具有两个亲本菌株所能产生的三种抗生素, 即5102-1号、5102-2号和5102-3号抗生素, FR-008菌株只能产生5102-1号和5102-2号抗生素, 而不能产生5102-3号抗生素。融合子所产生的这些抗生素的活性大多比原始出发菌株和亲本要强。除此以外, 三个融合子还都能产生两个亲本所没有的对酿酒酵母具有活性的抗生素, 而且这种抗生素的性质, 三个融合子也都各不相同。

关键词 原生质体融合; 遗传分析

自从 Hnpwood 等 (1977年) 报道了用聚乙二醇(PEG)诱导链霉菌原生质体融合并获得高频率的重组子以来^[1], 链霉菌原生质体融合的工作不断有所报道, 证实这种技术不仅可以改良菌种的遗传性状, 提高抗生素产量; 而且还能产生新的“杂种”抗生素^[2,3]。我们的工作是以农抗5102产生菌的两株不同营养缺陷型为融合亲本进行原生质体融合, 经MM上连续移植得到稳定的融合子, 并对其中三个融合子 (FR-001, FR-005 FR-008) 的营养特性、菌体形态、培养特征和抗菌活性等方面进行观察和分析。结果表明: 获得的三个融合子, 不论在表型、营养特性和抗菌活性等方面和两个融合亲本都有一定差别; FR-001菌株和FR-005菌株能产生原始出发菌株和融合亲本所能产生的三种抗生素(5102-1号、5102-2号和5102-3

号抗生素), FR-008菌株除了能产生5102-1号和5102-2号抗生素外, 不能产生5102-3号抗生素。而且不论那个融合子, 它们能产生的这些抗生素的活性大多强于亲本和原始出发菌株。此外, 三个融合子还都能产生两个融合亲本和原始出发菌株所不能产生的对酿酒酵母具有活性的抗菌物质。它们所产生的这类抗菌物质的性质也各不相同。本文报道这些实验的部分结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

1. 10-22菌株: 由5102-6菌株经诱变获得的原养型菌株。

2. WNF-2-1-135菌株($\text{arg}^- \text{leu}^+$), 从原养型的10-22菌株经NTG诱变获得。

本文于1986年5月2日收到。

3. WNF-2-1-90菌株(*leu⁻ arg⁺*): 从原养型的 10-22 菌株经NTG诱变获得。

4. 指示菌: 柑桔绿霉菌 (*Penicillium digitatum*)、稻纹枯病菌 (*Pellicularia sasakii*)、玉米小斑病菌 (*Helminthosporium turcicum*)、棉枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、苏云金杆菌以色列亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*)。

(二) 培养基

营养菌丝生长培养基、完全培养基 (CM)、基本培养基 (MM) 及P培养液见参考文献[4]。活性测定用的培养基: 真菌为马铃薯蔗糖琼脂; 细菌为牛肉膏蛋白胨琼脂; 酵母菌培养基 (%) 为: 葡萄糖 2, 蛋白胨 1, 酵母膏 0.5, 琼脂 2, 自然 pH; 融合子的摇瓶培养基为 (%): 黄豆饼粉 2, 可溶性淀粉 1, 葡萄糖 3, 蛋白胨 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, CaCO_3 0.6, pH7.0。

(三) 原生质体的制备和再生

方法参照前文报道^[4]。

(四) 融合处理

二个融合亲本的原生质体各取 0.5ml 相混合, 离心倾去上清液, 将离心管置多用振荡器 (GZ-1) 上振动, 使混合原生质体均匀分散于残留的 P 培养液中, 然后加入 4ml 40% PEG6000, 轻轻摇匀, 置 32℃ 水浴中保温 5min, 再离心除去上清液。沉淀物用 P 培养液洗涤一次后, 用 P 培养液定容 2ml, 并使原生质体均匀悬浮。

(五) 融合子的检出

取 0.1ml 经 PEG 处理的原生质体混合液, 涂布于 CM 平板上, 30℃ 保温培养 4—5 天, 待孢子成熟后, 用无菌牙签挑

取单菌落, 依次分别点种到 MM 和 CM 平板上, 保温培养 5—7 天, 将 MM 平板上长出的菌落, 分别接种到 MM 斜面上培养, 然后在此培养基上再连续移植培养 8 代仍能良好生长的, 即可作为融合子检出。

(六) 融合子的鉴别

1. 融合子营养特性的测定: 将融合亲本和融合子分别接种在 CM、MM、高氏合成培养基与 MM 和高氏合成培养基中补充有不同氨基酸的培养基上, 在 30℃ 中培养一周, 观察生长情况。在 MM 和高氏合成培养基上生长者为原养型, 不生长者为缺陷型。

2. 融合子的形态和培养特征的测定: 融合子和融合亲本分别接种在复盖有无菌透明纸的 CM 平板上, 经 30℃ 培养一周后, 在光学显微镜和电镜上观察孢子丝形态和孢子表面结构。在 CM 斜面上观察培养特征。

3. 融合子抗菌活性的测定: 以柑桔绿霉菌、稻纹枯病菌、玉米小斑病菌、棉枯萎病菌、酿酒酵母、苏云金杆菌以色列亚种和大肠杆菌等为指示菌。除稻纹枯病菌采用倒转法测定^[6]外, 其他指示菌都采用菌块法测定融合子和融合亲本的抗菌活性。

4. 融合子代谢产物性质的测定: 纸层析法^[6]采用酿酒酵母和苏云金杆菌以色列亚种进行生物显影, 具体方法参考所注文献。

实 验 结 果

(一) WNF-2-1-135 菌株和 WNF-2-1-90 菌株的原生质体种内融合

这一对在 MM 培养基上不能生长的营养缺陷型突变体, 经融合后, 通过间接选择

法, 将 MM 平板上能够生长的菌落分别移接在 MM 斜面上继续生长, 并连续移植培养8代以上, 结果证明这些移植的菌株都能良好生长; 然后将连续移植培养后的菌株, 分别做成孢子悬液, 涂沫在平板上长成单菌落, 并将单菌落打块进行活性测定。结果也表明, 不论从菌落大小、表型和抗菌活性方面来看, 每个菌株的单菌落都是比

较一致的, 没有分离现象。说明从MM平板上挑取出来的这些菌株, 都是稳定的融合子。

我们从中得到的8个融合子, 通过以柑桔绿霉菌为指示菌的初步鉴别, 发现其中有三个融合子, 即 FR-001、FR-005和FR-008 菌株具有较强的活性(表1)。

表 1 融合亲本和融合子抗柑桔绿霉菌活性的初步鉴别
Table I Preliminary characterization of antimicrobial activity between fusion parents and fusion products on *P. digitatum*

菌 株 Strains	融合亲本 Fusion parents		融 合 子 Fusion products							
	WNF- 2-1-135	WNF- 2-1-90	FR-001	FR-002	FR-003	FR-004	FR-005	FR-006	FR-008	FR-010
抗 菌 活 性 Antimicrobial activity	±	-	+++	+	-	-	+++	-	+++	-

(二) 融合子的营养特性

二个融合亲本的营养特性不同, WNF-2-1-135 菌株为精氨酸缺陷型 (arg⁻), WNF-2-1-90 菌株为亮氨酸缺陷型 (leu⁻), 它们在MM和高氏合成培养

基上均不生长, 只有当这些培养基中分别补充它们各自缺陷的氨基酸后才能生长。但融合后获得的三个融合子都能在MM和高氏合成培养基上生长(表2), 说明它们都是稳定的原养型融合子。

表 2 融合亲本和融合子的营养特性
Table 2 Nutritional properties of fusion parents and fusion products

菌 株 Strains		在 各 种 培 养 基 上 的 生 长 情 况 Growth on various medium								
		CM Comple- te medium	MM Main medium	MM + 亮 氨酸 MM + leu	MM + 精 氨酸 MM + arg	MM + 亮 氨酸 + 精 氨酸 MM + leu + arg	GSM Gause's synthetic medium	GSM + 亮氨酸 GSM + leu	GSM + 精氨酸 GSM + arg	GSM + 亮氨酸 + 精氨酸 GSM + leu + arg
融合亲本 Fusion parents	WNF-2-1-135	+	-	-	+	+	-	-	+	+
	WNF-2-1-90	+	-	+	-	+	-	+	-	+
融合子 Fusion products	FR-001	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FR-005	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FR-008	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ 生长 Growth; - 不生长 No growth; GSM 高氏合成培养基 Gause's synthetic medium; leu 亮氨酸 Leucine; arg 精氨酸 Arginine

(三) 融合子的形态及培养特征

1. 三个融合子的孢子形状和表面结构与两个亲本没有什么区别，它们都为圆柱形，表面光滑，但在孢子丝形态上则有一定差别，亲本的孢子丝都为3—5圈螺旋形，而三个融合子的孢子丝均为波曲

形。

2. 融合子在培养特征上和亲本有明显区别，而且不同融合子之间也表现了一些差异。表3说明不同融合子和二个融合亲本在培养特征上的差别。

表 3 融合亲本和融合子的培养特征
Table 3 Cultural characteristics of parents and fusion products

菌 株		培 养 特 征		
Strains		Cultural characteristics		
		气 丝 Aerial mycelium	基 丝 Substrate mycelium	可 溶 性 色 素 Soluble pigment
原始出发菌株 Starting strain	10-22	白至黑鼠灰，吸水 white to blackish mouse gray	暗 柠 檬 色 Dark citrine	黄 丹 黄 色 Massicot yellow
融合亲本 Fusion parents	WNF-2-1-135	白 至 鼠 灰 White to mouse gray	暗 柠 檬 色 Dark citrine	同 上 Ditto
	WNF-2-1-90	白 至 橄 榄 灰 White to olive gray	纯 赭 色 Raw umber	同 上 Ditto
融合子 Fusion products	FR-001	白 色 white	米 黄 色 Buff-yellow	无 None
	FR-005	白 色 white	赭 黄 色 Baryta-yellow	无 None
	FR-008	弹 壳 浅 黄 Cartridge buff	淡 赭 黄 色 Pale ochraceous-buff	无 None

(四) 融合子的抗菌活性

多次生物测定结果表明，融合子的生物合成能力的变化是多样的。根据对稻纹枯病菌、玉米小斑病菌和棉枯萎病菌等三株指示菌的测定，FR-001菌株和FR-005菌株能够产生融合亲本和原始出发菌株所能产生的三种抗生素，即5102-1号^[7]、5102-2号^[8]和5102-3号抗生素；而FR-008菌株只能产生5102-1号和5102-2号两种抗生素，不能产生5102-3号抗生素，不论是那个融合子，他们产生亲本和出发菌

株所能产生的这些抗生素，其活性大多都强于亲本和原始出发菌株（表4），而且对稻纹枯病菌的活性和原始出发菌株一样，也都能产生典型的异常分枝。此外，表4的结果还指出，三个融合子还均表现出亲本和原始出发菌株所没有的对酿酒酵母的抑菌活性。同时，也利用亲本和出发菌株对其没有活性的其他指示菌，如丝孢酵母、苏云金杆菌以色列亚种、大肠杆菌等的测定表明，不同融合子的抗菌谱也不一样（表5），说明它们可能并不属于同一物质。

表 4 融合亲本和融合子的抗菌活性
Table 4 Antimicrobial activity of fusion parents and fusion products

菌 株 Strains		抗菌活性 Antimicrobial activity (抑菌圈直径mm Diameter of inhibitory zone mm)			
		稻纹枯病菌* <i>Pel. sasakii</i>	玉米小斑病菌 <i>Coch. heterostropus</i>	棉枯萎病菌 <i>Fus. oxysporum</i>	酿酒酵母 <i>Sac. cerevisiae</i>
原始出发菌株 10-22 Starting strains 10-22		39.3	19.4	17.8	0
融合亲本 Parents	WNF-2-1-135	19.8	18.9	17.0	0
	WNF-2-1-90	33.8	19.2	13.3	0
融合子 Products	FR-001	10.5	19.5	20.5	16.4
	FR-005	10.3	31.4	20.8	11.5
	FR-008	11.0	25.2	0	15.4

* 用倒转法测定, 表中的数字为纹枯病菌菌落直径。直径越大活性越低。空白对照的直径为85mm

表 5 三个融合子的抗菌活性比较
Table 5 The comparison of antimicrobial activity of three fusion products

菌 株 Strains		抗 菌 活 性 Antimicrobial activity			
		酿酒酵母 <i>Sac. cerevisiae</i>	丝孢酵母 <i>Trich. cutaneum</i>	苏云金杆菌以色列亚种 <i>B.T. H14</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>
出发菌株 10-22 Starting strains 10-22		-	-	-	-
融合亲本 Parents	WNF-2-1-135	-	-	-	-
	WNF-2-1-90	-	-	-	-
融合子 Products	FR-001	++	-	++	++
	FR-005	++	+	++	-
	FR-008	++	++	-	-

(五) 融合子代谢产物的性质

三个融合子的代谢产物经过 Доско-илов 等推荐的八个溶剂系统的纸层析测定初步表明: FR-001菌株的层析谱, V、VI及V III三个溶剂不显迹, 可能属于肽类抗生素(图1-1, 用苏云金杆菌H14显影); FR-005 菌株的层析谱则属于水溶性抗生

素(图1-2, 用苏云金杆菌 H14 显影); 而 FR-008 菌株的层析谱则属于非水溶液抗生素(图1-3, 用酿酒酵母显影)。通过这些结果进一步说明不同融合子产生的对酿酒酵母具有活性的这类抗生素, 其性质是彼此不一致的。

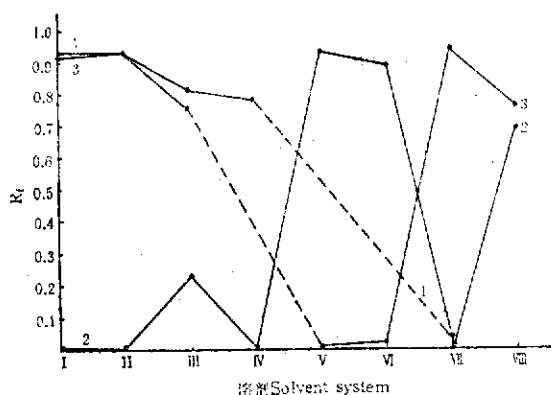


图 1 三株融合子的纸层析图谱

Fig. 1 Paper chromatogram of three products

1. 融合子 Fusion product FR-001
2. 融合子 Fusion product FR-005
3. 融合子 Fusion product FR-008

讨 论

WNF-2-1-135 和 WNF-2-1-90 两株营养缺陷型突变体的原生质体在 PEG 的助融下进行种内融合, 通过间接选择法获得融合子, 并以柑桔绿霉菌为指示菌进行初

步鉴别, 从中筛选到活性较强的三株融合子, 编号为 FR-001、FR-005 和 FR-008, 对其进行遗传分析, 表明这些融合子不论在表型特征上或者在遗传特性上均与融合亲本有明显区别。特别在抗菌活性上, 融合子所产生的 5102-1 号、5102-2 号和 5102-3 号抗生素不但大多比融合亲本和出发菌株要强, 同时还产生亲本和出发菌株所没有的对酿酒酵母有抑菌活性的抗生素, 而且其性质也各不相同。虽然目前还没有搞清这些抗生素的化学结构是不是一些全新的化合物, 但这些结果已可充分说明原生质体融合的遗传重组并不总是在同一位点上或以同一种方式进行, 而是以多种多样的方式进行重组的。从这一点来看, 原生质体融合技术不仅对链霉菌遗传学基础理论的研究有重要意义, 而且在工业菌株的改良上, 对提高产量和获得产生新抗生素的杂种菌株提供了新的有效手段。

参 考 文 献

- [1] Hopwood, D.A. et al., *Nature*, 268(14): 171-174, 1977.
- [2] Ochi, K., *J. Bact.*, 150:592, 1982.
- [3] Yamashita, F. et al., Abstracts of 4th Genetics of Industrial Microorganisms, Kyoto, June 6-11, 1982, p.108.
- [4] 梁蓉芳, 周 启: 华中农学院学报, 4(3):48-54, 1985.
- [5] 周 启, 刘锦林: 抗生素, 6(1) 1-6, 1981.
- [6] 张 瑞等: 全国第三次抗菌素学术会议论文集 (第一册), 科学出版社, 北京, pp.264-270, 1965.
- [7] 张声华等: 华中农学院学报, 1:39-43, 1981.
- [8] 张声华等: 微生物学报, 22(2):145-150, 1982.

STUDIES ON FUSION BREEDING OF PROTOPLASTS FROM ANTIBIOTIC PRODUCING STRAIN 5102

III. GENETIC ANALYSIS OF FUSION PRODUCTS

Liang Rongfang Zhou Qi

(Agricultural Antibiotic Laboratory, Huazhong Agricultural University, Wuhan)

This paper describes intraspecific protoplast fusion of two auxotrophic strains, WNF-2-1-135 and WNF-2-1-90, of *Streptomyces hygroscopicus* var.

yingchengensis n. var. in the prescence of polyethene glycol (PEG). The stable prototrophic strains were obtained by indirect selection method. Each recombinant strains were tested for their antimicrobial activity, using *Penicillium digitatum* as indicator strain. Three strains, FR-001, FR-005 and FR-008 were respectively found to be different from their parental strains in their antibiotic-producing properties.

Genetic analysis showed remarkable difference on morphologic and genetic characters between the recombinants and their parents, along with differences between individual recombinant. The capabilities of three recombinants to produce their parental antibiotics were stronger than their parental and starting strains. In addition, they produce new metabolites characteristic of each recombinants.

Key words

Protoplast fusion; genetic analysis