

黄绿木霉原生质体诱变育种研究

杨 谦¹ 孙冬梅^{1,2} 张 晶¹

(哈尔滨工业大学生命科学系 哈尔滨 150001)¹ (黑龙江八一农垦大学生命科学系 大庆 163319)²

摘要: 利用正交实验方法研究了影响黄绿木霉 (*Trichoderma aureoviride*) 原生质体形成的因素, 并利用紫外线、硫酸二乙酯、氯化锂几种因素复合诱变原生质体筛选高产纤维素酶菌株。影响原生质体形成的因子顺序是酶系统 > 菌龄 > 酶解时间 > 酶解温度, 原生质体形成的最佳条件是 0.5% 蜗牛酶 + 0.5% 溶菌酶 + 1.0% 纤维素酶, 菌龄为 18h, 酶解时间为 3.0h, 酶解温度为 32℃; 在该条件下原生质体产量可达到 4.25×10^6 个 mL^{-1} 。Ca²⁺ 和 PEG 对提高原生质体再生率的作用明显; 复合诱变后得到酶活显著提高、遗传性能稳定的诱变株 T-14, 其 EG 酶活与 BG 酶活分别提高了 58.43%、44.48%。

关键词: 黄绿木霉, 原生质体, 诱变, 育种

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0062-06

Protoplast Induced Mutation Breeding on *Trichoderma aureoviride*

YANG Qian¹ SUN Dong-Mei^{1,2} ZHANG Jing¹

(Department of Life Science Haerbin Institute of Technology University, Haerbin 150001) ¹

(Department of Life Science HeiLongjiang August First Reclamation University Daqing 163319) ²

Abstract: Based of the study on the impact of protoplasts under different conditions of enzymolysis solution, culture time, enzymolysis time and enzymolysis temperature in sequence using orthogonal test. The best optimal condition of producing protoplast was : 0.5% helicase add 0.5% lysozyme and 1.0% cellulase, enzymolysis time was 3 hours , enzymolysis temperature was 32℃, under these condition the production of protoplast can be 4.25×10^6 per mL. Ca²⁺ and PEG can increase the regeneration ratio of protoplast. After induced mutation by complex factor under DES, UV and LiCl, the mutagenesis strain which own increasing enzyme activity and transmissibility steady was obtained.

Key words: *Trichoderma aureoviride*, Protoplast, Induced mutation, Breed

原生质体作为单个脱壁的细胞, 可在渗透压稳定液中处于悬浮状态, 在释放过程中可包含较少的核或单核, 同时原生质体具有细胞的全能性及再生细胞壁的能力, 是一种良好的诱变材料, 原生质体诱变育种是获得高产菌株的一个行之有效的方法^[1,2]。目前纤维素酶的生产主要集中于真菌中的里氏木霉、绿色木霉等木霉菌种上, 而有关黄绿木霉纤维素酶的研究在国内外很少有报道^[3], 笔者在实验条件下分离到一株黄绿木霉, 该菌株产 β -葡萄糖苷酶的能力强于绿色木霉 AS3.3711 菌株, 解决了目前生产应用中木霉菌株 β -葡萄糖苷酶酶活低的矛盾, 在生产实践中具有潜在的应用价值; 鉴于自然界获得的原始菌株存在酶活低, 性能不稳定的缺点, 因而笔者对所获得的菌株进行了原生质体诱变, 以期得到能够在生产中应用的优良菌株, 并对原生质体的产生进行了研究, 为该菌株的进一步应用提供理论参考, 现将研究结果报道如下:

通讯作者 Tel: 0451-86412952, E-mail: yangq@hit.edu.cn

收稿日期: 2004-10-13, 修回日期: 2004-12-06

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株: 黄绿木霉 (*T. aureoviride*), 自分子于密山裴德地区土壤, 经中国科学院微生物研究所鉴定。

1.1.2 培养基: 完全培养基: PDA; 原生质体再生培养基: 葡萄糖 20g、蛋白胨 10g、酵母膏 10g、PEG6000 100g、CaCl₂ 1.11g、KCl 52.85g、琼脂 16g、H₂O 定容至 1,000mL, pH6.0, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20min; 初筛培养基: 羧甲基纤维素钠 10g、KH₂PO₄ 0.5g、MgSO₄ · 7H₂O 0.3g、琼脂 16g、H₂O 定容至 1,000mL, pH7.0, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20min; 液体产酶培养基: 秸秆粉 40g、麸皮粉 10g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1.4g、MgSO₄ · 7H₂O 0.3g、CaCl₂ 0.3g、FeSO₄ · 7H₂O 5mg、MnSO₄ 1.6mg、ZnCl₂ 1.7mg、CoCl₂ 1.7mg、吐温-80 6g、H₂O 定容至 1,000mL, pH5.5, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20min。

1.1.3 试剂: 渗稳剂 (0.7mol/L KCl, pH5.8): Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.1462g、NaH₂PO₄ · 2H₂O 5.7426g、KCl 10.347g, 溶于 160mL 双蒸水中, 用双蒸水定容至 200mL。

2% 纤维素酶、2% 蜗牛酶、2% 溶菌酶: 分别将 0.4g 各种酶溶于 20mL 渗稳剂 (含 5mmol/L DTT), 在 Vertex 上充分振荡溶解后, 4℃、10,000r/min 离心 10min, 用 0.22μm 的滤膜过滤除菌, 4℃ 冰箱保存。

原生质体诱变用试剂: 0.1mol/L pH7.2 的磷酸缓冲液, 25% Na₂S₂O₃ 溶液。

纤维素酶活测定用试剂: pH5.0, 0.02mol/L 乙酸—乙酸钠缓冲液, 1% CMC-Na 溶液, 1% 水杨苷溶液, DNS (3, 5-二硝基水杨酸) 试剂。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的制备与再生: A 黄绿木霉原生质体制备的最佳条件: 将黄绿木霉菌株接种于 PDA 试管斜面, 30℃ 培养 3d 后, 加入 10mL 无菌水洗下孢子, 4 层无菌擦镜纸过滤至装有玻璃珠的三角瓶中, 30℃、150r/min 振荡 5h, 使孢子完全分散和活化, 然后镜检观察, 调整孢子浓度至 10⁶ 个/mL。

将孢子悬液接种到菌丝液体生长培养基中, 设计一个菌龄、酶系统、酶解温度和酶解时间四因素三水平的正交试验来确定原生质体制备的最佳条件 (表 1)。

表 1 正交试验的因素水平设计表

序号	菌龄 (h)	酶系统	酶解温度 (℃)	酶解时间 (h)
1	16	0.5% 纤维素酶 + 0.5% 蜗牛酶 + 1.0% 溶菌酶	28	2.0
2	17	0.5% 纤维素酶 + 0.5% 溶菌酶 + 1.0% 蜗牛酶	30	2.5
3	18	0.5% 蜗牛酶 + 0.5% 溶菌酶 + 1.0% 纤维素酶	32	3.0

B 原生质体再生: 取适当稀释的原生质体悬液 0.2mL 涂布于原生质体再生培养基, 30℃ 培养 5d 后, 计算再生率。

设置再生培养基中添加 10mmol/L CaCl₂ 和 10% PEG6000 的对照组, 研究 Ca²⁺ 和 PEG6000 对原生质体再生的影响。

原生质体再生率 = 再生菌落数 / 原生质体 × 100%。

1.2.2 原生质体诱变处理: 原生质体悬液诱变处理技术路线:

原始菌株原生质体 $\xrightarrow{\text{DES 诱变}}$ $\xrightarrow{\text{UV 诱变}}$ $\xrightarrow{\text{LiCl 诱变}}$ $\xrightarrow{\text{再生}}$ 诱变菌株。

具体的诱变方法参见文献 [4], 稍有改进: 将上述黄绿木霉孢子悬液取 4mL 加入 16mL 磷酸缓冲液, 再加 DES 乙醇溶液 (0.5g/mL), 分别振荡处理 30min 后加入 0.5mL 25% 的硫代硫酸钠溶液终止反应, 将经 DES 处理过的孢子悬液, 置于培养皿中, 使之成为约 1mm 厚的薄层, 培养皿放于磁力搅拌器上置 30W 紫外灯下, 距离 10cm 照射; 紫外线照射时间分别为 1.0min、1.5min、2.0min、2.5min、3.0min, 后将处理的孢子悬液置于含 LiCl 浓度为 0.5% 的再生培养基中培养。

诱变后的原生质体再生后, 计算诱变后的原生质体再生率, 计算诱变存活率。

诱变存活率 = 诱变处理后原生质体再生率 / 未诱变原生质体再生率 × 100%。

将诱变菌株转接 PDA 斜面, 传代培养后, 以降解纤维素的能力作为指标来观察诱变菌株的性状是否变化。

1.2.3 高纤维素酶产量诱变菌株的筛选: (A) 诱变菌株的初筛: 将野生菌株和诱变菌株一起转接 PDA 平板, 28℃ 培养 3d 后, 用打孔器从 PDA 平板上打取菌落小块, 放置于初筛培养基平板上, 28℃ 培养 3d 后, 测量各菌株水解圈的直径, 选择水解圈直径比野生菌株大的诱变菌株进一步复筛。(B) 诱变菌株的复筛: 初筛后的诱变菌株和野生菌株一起, 以大约 10^7 个/mL 的孢子形式接入液体产酶培养基中, 28℃ ~ 30℃ 发酵培养 6d, 然后利用 DNS 法测定其 EG 酶活和 BG 酶活。实验规定在测定酶活的反应条件下, 每分钟产生 1 μ g 分子葡萄糖为 1 个酶活单位 (U)。(C) 诱变菌株传代实验: 将诱变菌株连续传代 5 代, 测定这 5 代的 EG 酶活和 BG 酶活, 确定诱变菌株产酶性能是否稳定。

2 结果

2.1 黄绿木霉原生质体的制备与再生

表 2 $L_9(3^4)$ 正交表

序号	菌龄 (h)	酶系统	酶解温度 (℃)	酶解时间 (h)	重复试验结果 10^6 个/mL		
					I	II	Σ
1	1	1	1	1	0.99	1.07	1.98
2	1	2	2	2	1.84	1.92	3.76
3	1	3	3	3	3.34	3.41	6.75
4	2	1	2	3	2.17	2.23	4.40
5	2	2	3	1	2.01	1.97	3.98
6	2	3	1	2	3.21	3.24	6.45
7	3	1	3	2	2.46	2.58	5.04
8	3	2	1	3	3.02	3.00	6.02
9	3	3	2	1	3.78	3.75	7.53
K1	12.49	11.42	14.45	13.49			
K2	14.83	13.76	15.69	15.25			
K3	18.59	20.73	15.77	17.17			
K1	4.16	3.81	4.82	4.20			
K2	4.94	4.59	5.23	5.08			
K3	6.20	6.91	5.26	5.72			
R	2.04	3.10	0.44	1.52			
因素主次	2	1	4	3			

2.1.1 黄绿木霉原生质体制备条件:经正交试验结果(表2)直观分析得出,酶系统是影响原生质体制备的最重要因素,这4个因素的重要性依次是酶系统>菌龄>酶解时间>酶解温度。黄绿木霉原生质体形成的最佳条件是:0.5%蜗牛酶+0.5%溶菌酶+1.0%纤维素酶,菌龄为18h,酶解时间为3.0h,酶解温度为32℃。在该条件下原生质体生成量可达到 4.25×10^6 个/mL。

为了判断试验因素之间的差异是来自于随机误差,还是来自于其本质的差异,通过计算方差,得出各因素的F比值。酶系统因素的 $F=195.48$;菌龄因素的 $F=78.93$;酶解时间因素的 $F=28.23$;酶解温度因素的 $F=4.58$ 。查F分布表得临界值 $F_{0.01}(2,9)=8.02$, $F_{0.05}(2,9)=4.26$ 。酶系统、菌龄和酶解时间这3个因素的F值均大于8.02,说明酶系统、菌龄和酶解时间这3个因素的各水平对黄绿木霉原生质体制备的影响有极显著的差异。酶解温度因素的F值大于4.26,小于8.02,说明酶解温度因素是黄绿木霉原生质体制备的显著影响因素。

2.1.2 黄绿木霉原生质体释放:黄绿木霉原生质体和其它丝状真菌一样,有顶端释放和原位释放两种情况。酶解前的菌丝如图1(A)所示表面光滑平整。酶解1h后,如图1(C)所示,菌丝顶端细胞壁被酶裂解形成通道,原生质体也由此释放,这就是原生质体的顶端释放;酶解2h后,大量菌丝细胞壁消失,菌丝体被酶解成片段,原生质体在原位形成自然的球状体,形成如图1(B)所示的呈串珠状排列,这就是原生质体的原位释放;酶解3h后,如图1(D)所示,细胞壁局部被完全酶解,大量原生质体释放,直径在 $5\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ 之间大小不一,形成一个一个的球状体。

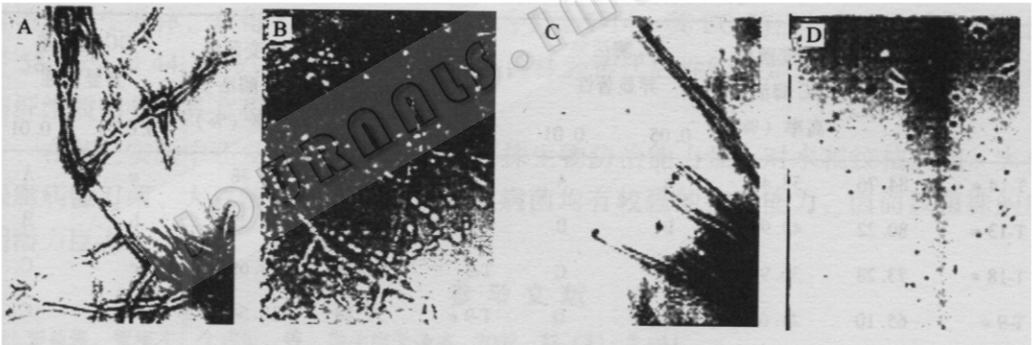


图1 黄绿木霉原生质体释放过程

2.1.3 黄绿木霉原生质体再生:黄绿木霉原生质体再生率:再生培养5d后,在再生培养基平板上出现了一些单菌落,原生质体再生率为13.9%。再生促进因子对黄绿木霉原生质体再生率的影响:在对比实验中,没有添加 10mmol/L Ca^{2+} 的再生培养基上的再生率为11.2%,而在没有添加10%PEG6000的再生培养基上的再生率为12.5%。在添加了 10mmol/L Ca^{2+} 和10%PEG6000的再生平板上的再生率为13.9%。经方差分析, Ca^{2+} 和PEG对提高原生质体再生率的作用明显。

2.2 黄绿木霉原生质体诱变

2.2.1 紫外光对黄绿木霉原生质体的致死效应:诱变实验采用的是将原生质体诱变后,涂布于再生培养基再生的方法。在诱变实验中首先将孢子悬液用DES处理后再选用不同紫外照射时间,从再生出的菌落数量来看,照射1.0min后,存活率为3.8%;照射1.5min后,存活率为1.6%,照射2.0min后存活率为0.2%;而照射2.5min和3.0min后,都不再有存活的菌落出现。综合以上,选用了2.0min的照射时间作为紫外

诱变的诱变计量。

2.2.2 黄绿木霉原生质体诱变与初筛：原生质体诱变后再生，一共得到诱变菌株 52 株。诱变存活率为 0.2%，诱变致死率为 99.8%。将诱变菌株从再生培养基上转接 PDA 试管中保存，利用初筛培养基以水解圈大小作为指标进行诱变菌株的初筛，筛选出具正向突变的诱变菌株 14 株，正向突变率为 26.9%。

2.2.3 黄绿木霉诱变菌株的复筛：A 复筛菌株的纤维素酶活比较：将经初筛选出的 14 株正向突变菌株在产酶培养基中培养进一步复筛的结果如表 3，4 所示。EG 酶活有大幅度提高的诱变菌株有 T-14、T-13、T-18、T-9、T-21 和 T-40，它们的 EG 酶活分别提高了 58.43%、49.94%、36.97%、21.68%、17.68% 和 13.68%。而 BG 酶活有较大幅度提高的诱变菌株有 T-14、T-13、T-3、T-9、T-21、T-43 和 T-18，增幅分别为 44.48%、33.32%、19.69%、18.54%、13.08%、11.10% 和 10.08%。综合 EG 酶活和 BG 酶活复筛的情况，选取了两种酶活都有大幅度提高的 T-9、T-13、T-14、T-18 和 T-21 作为复筛获得的菌株。

表 3 的差异显著性分析也表明，T-9、T-13、T-14、T-18 和 T-21 在 EG 酶活上与其它菌株的差异是极显著的；在 BG 酶活上除了 T-18 和 T-43 差异不显著外，其余的也都是差异极显著的。

B 传代实验结果：T-9、T-13、T-14、T-18 和 T-21 传代实验结果如表 4，证明这些诱变菌株产酶性能稳定。

表 3 诱变菌株与野生菌株复筛酶活测定结果

菌株	EG 酶活 (U/mL)	诱变菌株 EC 酶活提高率 (%)	EC 酶活差异显著性		菌株	BG 酶活 (U/mL)	诱变菌株 BG 酶活变化率 (%)	BG 酶活差异显著性	
			0.05	0.01				0.05	0.01
T-14 *	84.76	58.43	a	A	T-14 *	62.5	44.48	a	A
T-13 *	80.22	49.94	b	B	T-13 *	57.24	32.32	b	B
T-18 *	73.28	36.97	c	C	T-3	51.78	19.69	c	C
T-9 *	65.10	21.68	d	D	T-9 *	51.28	18.54	d	C
T-21 *	62.96	17.68	e	E	T-21 *	48.92	13.08	e	D
T-40	60.82	13.68	f	F	T-43 *	48.06	11.10	f	E
T-32	58.26	8.90	fg	FG	T-18	47.62	10.08	f	E
T-12	58.00	8.41	g	FG	T-35	43.46	0.46	g	F
T-27	57.56	7.59	g	G	T-12	43.44	0.42	g	F
T-8	56.74	6.06	h	GH	T-48	43.4	0.32	g	F
T-48	56.06	4.79	i	H	T	43.26	-	g	F
T-43	55.72	4.15	ij	HI	T-8	42.9	-0.83	g	F
T-35	55.18	3.14	j	I	T-27	41.88	-3.19	h	G
T-3	54.52	1.91	k	I	T-32	40.66	-6.01	i	H
T	53.5	-	i	J	T-40	39.52	-8.65	j	I

表 4 传代后各诱变菌株的酶活

菌株	EC 酶活 (U/mL)					BC 酶活 (U/mL)				
	1 代	2 代	3 代	4 代	5 代	1 代	2 代	3 代	4 代	5 代
T-9	65.08	64.94	65.17	65.12	65.05	51.22	51.18	51.30	51.25	51.14
T-13	80.17	80.30	80.09	80.31	80.21	57.19	57.21	57.13	57.27	57.25
T-14	84.74	84.59	84.53	84.64	84.67	62.51	62.39	62.61	62.48	62.40
T-18	73.29	73.22	73.35	73.18	73.34	47.61	47.54	47.49	47.68	47.55
T-21	62.88	62.91	63.02	62.96	62.91	48.87	48.97	49.01	48.94	48.84

3 结论与讨论

在影响黄绿木霉菌株原生质体形成的因素中, 主要影响因子为酶系统。不同微生物细胞壁的组成不完全相同, 霉菌细胞壁的主要成分为纤维素、几丁质, 通常采用蜗牛酶、纤维素酶等来水解细胞壁。因而在处理黄绿木霉时选择 0.5% 蜗牛酶 + 0.5% 溶菌酶 + 1.0% 纤维素酶, 菌龄为 18h, 酶解时间为 3.0h, 酶解温度为 32℃ 比较适宜, 可以获得高的原生质体量而且在实验中也检测了 Ca^{2+} 及 PEG 对原生质体再生的影响, 研究发现 Ca^{2+} 和 PEG 对提高原生质体再生率的作用明显, 这与资料报道的相同。

原生质体由于剥除了细胞壁, 对外界环境变化十分敏感, 采用理化因素复合诱变原生质体对于获得性能稳定酶活提高的菌株是可行的。本实验利用 DES、UV 及 LiCl 复合诱变原生质体, 获得了酶活显著提高的诱变株 T-14, 其 EG 酶活与 BG 酶活分别提高了 58.43% 及 44.48%, 获得的酶活提高的菌株经传代后性能稳定, 对纤维素酶的生产与纤维质的分解具有积极意义。

在其它实验中还发现, 该黄绿木霉菌株生物防治能力强, 对水稻纹枯病菌、大豆根腐病镰刀菌、大豆菌核病菌与杨树烂皮病菌均有较强的抑菌能力, 因而该菌株的应用潜力巨大。

参考文献

- [1] 彭益强, 贺淹才, 全成恒, 等. 微生物学杂志, 2002, 22 (5): 7~11.
- [2] 张宇昊, 王 颢, 张 伟, 等. 纤维素科学与技术, 2004, 12 (2): 18~22.
- [3] Perelló A, Mónaco C, Simón M R, et al. Crop Protection, 2003, 22 (9): 1099~1106.
- [4] 王弋博, 刘向阳, 李三相, 等. 青海大学学报 (自然科学版), 2003, 21 (4): 7~10.
- [5] 孙剑秋, 周东坡. 生物学通报, 2002, 37 (7): 9~11.
- [6] Thomas K R, Davis B. Microbiology, 2000, 28 (11): 69~80.
- [7] 张文学, 刘春莉, 蒋 宏. 四川大学学报, 2003, 35 (6): 66~70.
- [8] 黄 晶, 刘 峰, 刘 勇. 中国抗生素杂志, 2002, 27 (3): 138~140.