

吸水链霉菌应城变种和庆丰链霉菌种间原生质体融合及其融合子的生物学特性

周秀芬 周 启

(华中农业大学农抗研究室, 武汉)

本文报道利用抗生素产生菌吸水链霉菌应城变种WNF-2-1-90-11菌株(Leu^-Sm^R)和庆丰链霉菌 A_{553-1} 菌株(Pro^-Sm^R)为亲株,以42%的PEG4000为助融剂,进行了种间原生质体融合,用间接法检出融合重组子38株,其重组频率约为 4.5×10^{-4} 。重组子除孢子丝形态外,孢子堆颜色、抗药性、抗菌活性和抗生素生物合成能力方面与亲株均有一定差别,而且不同重组子之间也不相同,特别在抗菌活性方面,其中重组子FL-42和FL-48不仅具有两个亲株所产生的4种抗生素的活性,而且还产生两个亲株不具有的活性物质。通过纸层析谱表明,这种活性物质,两个重组子之间也不相同。

关键词 原生质体融合; 吸水链霉菌应城变种; 庆丰链霉菌; 融合重组子

链霉菌是重要的抗生素产生菌。自从70年代后期将原生质体融合技术应用于该菌的遗传育种研究以来,通过这一技术进行的链霉菌种内或种间的融合重组,在一定程度上获得了改善菌种的遗传性状,从而提高抗生素的生产能力,以及综合不同亲株的代谢途径而产生新抗生素^[1-6]。说明原生质体融合可为抗生素产生菌的重组研究和遗传改良提供新的途径。

本文报道以防治农作物病害有良好效果的抗生素产生菌吸水链霉菌应城变种和庆丰链霉菌为亲株所进行的种间原生质体融合的部分实验结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

1. 吸水链霉菌应城变种(*Streptomyces hygroscopicus* var. *yingchengensis*)的遗传标记菌株: WNF-2-1-90-11(Leu^-Sm^R)。该菌株产生三种抗生素,

即5102-I、5102-II和5102-III,它们分别对水稻纹枯病菌、玉米小斑病菌和棉花枯萎病菌有抑制活性。

2. 庆丰链霉菌(*S. qingfengmyceticus*)的遗传标记菌株: A_{553-1} (Pro^-Sm^R)。该菌株产生庆丰霉素,对稻瘟病菌有抑制活性,系由上海植生所郑幼霞教授提供的 A_{553} 菌株经筛选获得的抗链霉素突变体。

3. 测定抗菌活性的试验菌: 稻纹枯病菌(*Pellicularia sasakii*)、玉米小斑病菌(*Helminthosporium maydis*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、稻瘟病菌(*Piricularia oryzae*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、掷孢酵母(*Sporobolomyces roseus*)、皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、K酵母(*Saccharomyces* K)。

本文于1988年8月5日收到。

(二) 培养基和溶液

1. 菌丝体生长培养基有机A 和原生质体稳定液成分参照文献[7]。

2. 完全培养基 (CM) 和基本培养基 (MM) 成分参照文献[8]。

3. 再生培养基 R₂ 成分参照文献[11]。

4. 吸水链霉菌应城变种和庆丰链霉菌摇瓶发酵培养基成分参照文献[6,9]。

(三) 原生质体制备、诱导融合及融合重组子检出的方法 参照文献[4,6,7]。

(四) 融合重组子的抗菌活性及其代谢产物的纸层析谱测定 参照文献[6,10]。

实验结果

(一) 融合重组子的检出及初步鉴别

实验以WNF-2-1-90-11和A₅₅₃₋₁作为配对亲株,在42% (W/V) PEG4000的助融下进行了原生质体的种间融合,采用间接选择法获得38株融合重组子,其重组频率为 4.5×10^{-4} (表1)。

获得的38株融合重组子以及两个亲

表1 WNF-2-1-90-11和A₅₅₃₋₁的种间融合重组
Table 1 Interspecific fused recombination of WNF-2-1-90-11 and A₅₅₃₋₁

亲株 Parents	检测菌落的总数(个) Amount of colonies tested	原养型重组子数(个) Amount of prototrophic recombinants	重组频率 Recombination frequency
WNF-2-1-90-11 × A ₅₅₃₋₁	83591	38	4.5×10^{-4}

株,分别通过摇瓶发酵,以*P. sasakii*、*H. maydis*、*F. oxysporum*和*P. oryzae* 4种植物病原真菌和5种酵母菌为试验菌,检测它们的抗菌活物,结果见表2。

从表2的结果可以看出,两个亲株都保持它们各自所能产生的活性物质。而38株重组子则在抗菌活性上显示出广泛的多样性,对每个重组子来说,有的保留两个

表2 融合亲本和重组子抗菌活性的初步鉴别

Table 2 Preliminary characterization of the antimicrobial activities of parents and recombinants

试验菌 Indicator strains	亲株 Parents		重组子活性分类 The taxis of recombinant activity (%)			
	WNF-2-1-90-11	A ₅₅₃₋₁	I	II	III	IV
植物病原菌 Plant Pathogenic fungi						
<i>P. sasakii</i>	+	+	21.1	12.5	62.5	25.0
<i>H. maydis</i>	+	-	63.2	0	0	100
<i>F. oxysporum</i>	+	-	36.8	9.1	0	90.9
<i>P. oryzae</i>	+	+	23.7	NT	NT	NT
酵母菌 Yeast						
<i>C. tropicalis</i>	-	±	5.3	NT	NT	NT
<i>Spo. roseus</i>	-	+	5.3	50	0	50
<i>Sac. K</i>	-	+	5.3	0	0	100
<i>Sac. cerevisiae</i>	-	+	5.3	0	0	100
<i>Trich. cutaneum</i>	-	-	5.3	NT	NT	NT

“+”: 有活性 Active; “-”: 无活性 No activity; “±”: 活性可疑 with doubt; “NT”: 没有测定 Not tested

I: 有活性的重组子占全部重组子的百分数; The ratio of active recombinants to total recombinants

II 活性小于亲株的 Less active than both parents

III 活性介于亲株之间的 Activity between both parents

IV 活性大于亲株的 More active than both parents

亲株所有的活性物质，有的则失去亲株所产生的一种或几种活性物质；有少数重组子还能产生亲株所没有的活性物质。此外，从活性物质的强度来看也很不一致，有的超过亲株，有的介于亲株之间，有的则小于亲株。

(二) 重组子FL-42和FL-48的生物学特性

从38株重组子的初步鉴别中，发现两株重组子：FL-42和FL-48，不仅保留了配对亲株所产生的4种抗生素的活性，而且还产生配对亲株所没有的对皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 有抑制活性的物质，从而对它们作进一步的生物学特性试验。

1. 重组子稳定性的测定：以掷孢酵母菌为试验菌，测定融合重组子FL-42和FL-48的单孢子活性。结果表明，全部由单孢子长成的单菌落菌块所显示的抑菌圈大小皆均匀一致，没有任何分离现象，说明这两株重组子是稳定的重组子。

2. 重组子营养要求及抗药性的检测：结果表明，由于两个亲株为不同氨基酸缺陷型菌株，因此在MM上均不生长，而融合后获得的重组子则生长良好，说明它们是稳定的原养型重组子（表3）。

通过抗药性检测表明，两个重组子都保留亲株抗链霉素的特性，但和亲株相比，对Sm和Gm的抗性明显减弱，而对Km的抗性却增强了，结果见表3。

表 3 融合亲株和重组子的营养特性和抗药性的比较

Table 3 Comparison of nutritional properties and drug resistance between fusion parents and recombinants

菌 株 Strains	亲 株 Parents		重 组 子 Recombinants	
	WNF-2-1-90-11	A ₅₅₃₋₁	FL-42	FL-48
营 养 特 性 Nutritional properties	Leu ⁻ Auxotrophic	Pro ⁻ Auxotrophic	原 养 型 Prototrophic	原 养 型 Prototrophic
抗 药 性 Drug resistance	Sm ^R	1500µg/ml	300µg/ml	600µg/ml
	Km ^R	2 "	50 "	10 "
	Gm ^R	2 "	25 "	<2 "

Sm: 链霉素, Km: 卡那霉素, Gm: 庆大霉素

3. 重组子的孢子丝形态和培养特征：在光学显微镜上观察亲株和重组子的孢子丝形态表明，两者比较接近；但在

CM上生长的孢子堆颜色却有明显差别（表4）。

4. 重组子的抗菌活性：经多次生物

表 4 融合亲本和重组子的孢子丝形态和孢子堆颜色的比较

Table 4 Comparison of spore hyphae and spore color between fusion parents and recombinants

菌 株 Strains	亲 株 Parents		重 组 子 Recombinants	
	WNF-2-1-90-11	A ₅₅₃₋₁	FL-42	FL-48
孢子丝形态 Spore hyphae	螺旋型 Spirals	波曲至松螺旋 Flexibilis to slack spirals	波 曲 Flexibilis	波曲至松螺旋 Flexibilis to slack spirals
孢子堆颜色 Spore color	橄 榄 灰 Olive gray	淡 灰 白 Pale gray white	赭 色 Sienna	淡肉桂色 Pale cinnamon

测定结果表明。亲株 WNF-2-1-90-11 对稻纹枯病菌、玉米小斑病菌、棉枯萎病菌和稻瘟病菌都有抑制活性，而亲株 A₅₅₃₋₁ 只对稻瘟病菌和稻纹枯病菌有活性，但

是，重组子FL-42和FL-48都保留了两个亲株各自所具有的抗4种病原真菌的全部抑菌活性，而且在抑制玉米小斑病菌和稻瘟病菌的强度上，重组子都超过了亲株。

对酵母菌的活性测定表明,亲株 WNF-2-1-90-11 对测定的 5 株酵母菌都无活性,而亲株 $A_{5.53-1}$ 除了对皮状丝孢酵母菌无活性外,对其他酵母菌都具有不同强度的抑制活性;但是重组子 FL-42 和

FL-48 不仅对亲株 $A_{5.53-1}$ 具有活性的 4 种酵母菌都有抑制活性外,而且还表现出 $A_{5.53-1}$ 所没有的对皮状丝孢酵母具有活性的抗生素(表 5)。

5. 重组子代谢产物的纸层析谱: 虽

表 5 融合亲本和重组子对酵母菌的抑菌活性
Table 5 Antimicrobial activity of fusion parents and recombinants on yeast

菌 株 Strains		抗 菌 活 性 Antimicrobial activity				
		孢 菌 酵 母 <i>Spor. roseus</i>	K 酵 母 <i>Sac. K</i>	酿 酒 酵 母 <i>Sac. cerevisiae</i>	热 带 假 丝 酵 母 <i>Can. tropicalis</i>	皮 状 丝 孢 酵 母 <i>Trich. cutaneum</i>
亲 株 Parents	WNF-2-1-90-11	-	-	-	-	-
	$A_{5.53-1}$	+	+	+	±	-
重 组 子 Recomb- inants	FL-42	+	+	+	+	+
	FL-48	+	+	+	+	+

然重组子 FL-42 和 FL-48 及亲株 $A_{5.53-1}$ 的代谢产物对酿酒酵母 (*Sac. cerevisiae*) 均有抑制活性,但以该菌株为试验菌,经过 Доскочиловъ 等^[12] 推荐的 8 个溶剂系统的纸层析测定结果初步表明,两个重组子和亲株的纸层析谱不相一致,亲株 $A_{5.53-1}$ 的层析谱和它所产生的庆丰霉素的层析谱完全一致,属水溶性抗生素;而两个重组子的纸层析谱则属非水溶性抗生素,说明它们的活性物质是不相同的。而且从纸层析谱来看,两个重组子的活性物质彼此也有一定差异。

讨 论

(一) 种间原生质体融合及重组子的检出

吸水链霉菌应城变种和庆丰链霉菌的种间原生质体融合的重组频率为 4.5×10^{-4} , 比资料中报道^[1,4,18] 的链霉菌种间原生质体融合的重组频率 $10^{-5} - 10^{-7}$ 要高一些。但通过测定重组子单孢子活性是均一的,表明它们是稳定的,而且亲株营养缺陷型标记的自发回复突变率均 $< 10^{-6}$,

比重组频率低 $10^2 - 10^6$ 。由此可知融合试验中检出的原养型重组子不可能是亲株回复突变所致,而是一些稳定的重组子。

检出的 38 株重组子,经过抑菌活性的初步鉴别后发现,不同重组子之间,表现出多种多样的活性变化。这一方面可能是由于链霉菌与抗生素产量有关的信息相当丰富,在链霉菌的基因组中,影响某个抗生素产量的基因占基因组的 1%,相当于 1.5×10^5 碱基对^[14];另一方面,由于通过原生质体融合,可以使两个亲株细胞的整个染色体和细胞质,即带有全部基因表达所需要的物质都被囊入一个原生质体中,从而使基因重组范围更广泛,更随机,其结果必然可以得到更多的多因子交换的重组子,由此可以筛选获得有经济价值的新杂种,这也显示出种间原生质体融合育种的一种优越性。

(二) 重组子 FL-42 和 FL-48 的生物学特性

FL-42 和 FL-48 的生物学特性试验结果表明,除了培养特征与亲株有一定差别外,它们既保留了亲株的形态特征,抗 Sm 特性,又囊括了两个亲株各自所具有的

4 种抗生素的活性,而且还表现出两个亲株都没有的对皮状丝孢酵母有活性的物质。此外,亲株 WNF-2-1-90-11 对酿酒酵母没有活性,而亲株 A₅₅₃₋₁ 和两株重组子则都对酿酒酵母有抑菌活性。但是通过以酿酒酵母为试验菌的纸层析谱进一步表明,亲株 A₅₅₃₋₁ 和重组子的层析谱却完全不同,前者 and 庆丰霉素的层析谱一样,属水溶性抗生素;后者则为非水溶性抗生素。而且从层析谱来看,两个重组子

之间的这类物质也不完全相似。重组子产生的不同于亲株的新的活性物质可能是通过种间融合而产生的新代谢产物。

从本实验所得到的融合重组子的生物学特性结果来看,利用原生质体融合技术作为工业菌株育种的一种新的有效手段来提高抗生素生产能力和选育产生新代谢产物的杂种是完全有可能的,而且也是很有潜力的。

参 考 文 献

- [1] Yamoshita, F. et al.: *J. Antibiotics*, 38(1):58—63, 1985.
- [2] Yamoshita, F. et al.: *J. Antibiotics*, 38(1):126—127, 1985.
- [3] Hotta, K. et al.: *J. Antibiotics*, 38(1):64—69, 1985.
- [4] 郑幼霞等: 生物工程学报, 1(3):32—37, 1985.
- [5] 徐小雪等: 生物工程学报, 1(4) 47—53, 1985.
- [6] 梁善芳, 周启: 生物工程学报, 3(2) 130—136, 1987.
- [7] 梁善芳, 周启: 华中农学院学报, 4(3) 48—54, 1985.
- [8] 袁丽蓉: 抗生素, 8(8):380—387, 1983.
- [9] 上海植生所微生物室抗组: 微生物学报, 15(2):101—109, 1975.
- [10] 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, 1985.
- [11] Okanishi, M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 80:389—400, 1974.
- [12] Доскочилова, Д. et al.: *Антибиотики*, 6:649—659, 1961.
- [13] Godfrey, O. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 24(8):994, 1978.
- [14] Normansell, J. D.: *J. Chem. Techn. Biotechnology*, 32:296—303, 1983.

INTERSPECIFIC PROTOPLAST FUSION BETWEEN *STREPTOMYCES HYGROSCOPICUS* VAR. *YINGCHENGENSIS* AND *STREPTOMYCES* *QINGFENGYMYCETICUS*, AND CHARACTERIZATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF THEIR RECOMBINANTS

Zhou Xiufen Zhou Qi

(Agricultural Antibiotic Laboratory, Huazhong Agricultural University, Wuhan)

The recombination frequency between *Streptomyces hygrosopicus* var. *yingchengensis* and *Streptomyces qingfengmyceticus* by interspecific protoplast fusion was 4.5×10^{-4} . Characterization of biological properties revealed differences in the colours of the spore mass, drug resistance, antimicrobial activity and the capacity of producing antibiotics among recombinants and with respect to their parents. Two of the recombinant strains, FL-42 and FL-48, combined the productivities of the antibiotics which were originally produced by the two parents separately. In addition, they produced two compounds with antimicrobial activities that two parents could not produce.

Key words

Protoplast fusion; *Streptomyces hygrosopicus* var. *yingchengensis*;
Streptomyces qingfengmyceticus; fused recombinant