

农抗 5102 产生菌与泾阳链霉菌 5406 融合的初步研究

张 修 军

周 启

(湖北农学院植保系 荆州市 434103)

(华中农业大学农抗研究室)

摘 要

本文报道农抗 5102 产生菌衍生菌株 90-11 和 WH-1 与泾阳链霉菌 5406 之间融合研究的前期结果。研究表明,二级生长培养基中蔗糖浓度增加至 17% 及匀浆打散菌丝团,均能提高 5406 菌株的原生质体释放量。农抗 5102 产生菌与泾阳链霉菌原生质体制备的适宜条件差异较大。菌株 90-11 和 WH-1 较易酶解,适宜条件为:32℃,溶菌酶量 2-4mg/ml,1-1.5h;而 5406 菌株需相对较高的酶量和较长的酶解时间:32℃,溶菌酶量 6-8mg/ml;1.5-2h。各菌株原生质体在 -20℃ 下冻存,一个月内可维持 70% 以上相对再生率。以 50% PEG1000 诱导融合,利用抗性标记检出融合子,测定农抗 5102 产生菌与泾阳链霉菌 5406 的种间融合频率为 10^{-4} 。

关键词 农抗 5102 产生菌;泾阳链霉菌 5406;原生质体融合

吸水链霉菌应城变种 (*Str. hygrosopicus var yingchengensis* Yan et Ruan)^[1]——农抗 5102 产生菌产生 3 种不同的抗生素,其中 5102-I 号素与有效霉素和井冈霉素相似,对水稻纹枯病、棉花立枯病等具有良好的防治效果;5102-II 号素是一种多肽类物质,对玉米小斑病菌、棉花炭疽病菌等有效;III 号素结构未明,对棉花枯萎病菌具有抑制作用^[1,2]。1992 年,覃重军等采用 DNA 重组技术,获得了一株农抗 5102 产生菌的基因工程菌株 WH-1,它能超量表达 5102-I、II、III 号抗生素,并产生一种新的对水稻纹枯病菌及红酵母有抑菌圈活性的物质——5102-IV 号素^①。然而,该菌株存在着严重的遗传不稳定性,使它的开发应用受到限制。泾阳链霉菌 (*Str. jingyangensis* Tao) 5406 产生多种具有防病增产作用的生理活性物质,其抗生素菌肥在多种作物上有广泛的使用^[3],为构建综合农抗 5102 产生菌优良的抗菌性能和泾阳链霉菌 5406 的防病增产性能的遗传重组菌株,1994 年以来,我们开展了二菌间原生质体融合研究。本文报道前期部分试验结果。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源

遗传标记菌株 90-11 ($Str^R Tet^R$),由 WNF2-1-90-11^[4]经诱导并筛选获得的抗链霉素 800 μ g/ml 及四环素 100 μ g/ml 的突变性,以下称 90-11。

^① 覃重军,吸水链霉菌应城变种载体宿主系统的发展及其抗生素生物合成的遗传操作。华中农业大学博士学位论文,1992。

菌株 WH-1 (Thio^R), 具有硫链丝菌素抗性的基因工程菌株, 覃重军博士提供。

标记菌株 5406 (Rif^R) 由泾阳链霉菌 (武汉大学陶天申教授赠) 诱导并筛选获得的抗利福平 500 μ g/ml 的突变株, 以下称 5406。

1.2 培养基

菌丝体生长一级培养采用 2cm 液体培养基^[5], 二级培养采用有机 A 培养基^[5], 添加 10.3% 蔗糖, 用于菌株 90-11 和 WH-1 的培养; 添加 17% 蔗糖用于菌株 5406 的培养。再生培养基 R₂YE 及高渗 P 培养液参考文献^[7], 再生培养上层培养基为 P 培养液 + 0.6% 琼脂。

1.3 试剂

溶菌酶为中国科学院上海生物化学研究所产品, 用 P 培养液配制, 过滤除菌。硫酸链霉素和利福平分别为华北制药厂和东北制药总厂产品, 四环素和硫链丝菌素均为 Sigma 公司产品。

1.4 原生质体的制备

实验采用在二级培养基中生长 20h 的菌丝体制备原生质体, 制备方法参见文献^[7]。菌株 5406 因生长结团, 先以匀浆器研磨打散后酶解。用不完的原生质体可置于 -70℃ 或 -20℃ 下冰冻保存。

1.5 原生质体的再生

采用双层平板法再生, 下层培养基为 R₂YE, 上层为 0.6% 的 P 液培养基。再生率的计算方法参照文献^[6]。

1.6 原生质体融合及融合子的检出

以 50% PEG1000 为助融剂诱导融合, 融合方法参照文献^[7]。融合液涂于 R₂YE 平板后, 采用双层法再生。28℃ 培养 20h 后, 在各融合组合中, 分别以下列浓度抗生素混合液 1ml 涂皿: 90-11 × 5406: 1000 μ g/ml Str + 1000 μ g/ml Rif; WH-1 × 5406: 300 μ g/ml Thio + 1000 μ g/ml Rif, 继续培养 7d, 参照文献^[7]的方法计算融合频率。

2 结果与分析

2.1 原生质体的制备和再生

以各菌株菌丝体制备原生质体发现, 菌株 90-11 和 WH-1 在常规条件下较易溶菌, 菌株 5406 则较为困难。在二级培养基中添加 0.2-1% 甘氨酸, 则严重抑制菌丝体的生长, 24 小时湿重分别由 3.91g 降至 2.15g 和 0.48g, 因而难以用于原生质体的制备。将二级培养基中的蔗糖浓度提高至 17%, 可使菌丝团较为松散, 原生质体释放量明显增加 (表 1)。如果在酶解前, 将菌丝团用匀浆器研磨数次, 使菌丝体分散, 则更能促进原生质体的释放 (表 2)。

表 1 二级培养基中蔗糖浓度对 5406 原生质体释放的影响*

蔗糖浓度 (%)	5	10.3	17
菌丝体生长状态	颗粒状	颗粒状	细颗粒状
原生质体释放量 (个/ml)	7.2 × 10 ⁶	1.5 × 10 ⁷	1.2 × 10 ⁸

* 酶解条件: 32℃, 溶菌酶量 6mg/ml, 2h。

表 2 匀浆对 5406 原生质体释放的影响*

		(原生质体数/ml)			
酶解时间 (h)	0.5	1.0	1.5	2.0	
不匀浆	-	7.7 × 10 ⁵	3.4 × 10 ⁶	2.3 × 10 ⁷	
匀浆	3.2 × 10 ⁶	1.4 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁶	3.6 × 10 ⁸	

* 在 32℃、溶菌酶量 6mg/ml 下酶解。

研究不同溶菌酶浓度、不同酶解时间对原生质体释放的影响表明,各菌株在32℃时的适宜酶解条件为:90-11:溶菌酶量2-4mg/ml,酶解时间1-1.5h;WH-1:溶菌酶量2mg/ml,酶解时间1-1.5h;5406:溶菌酶量6-8mg/ml,酶解时间1.5-2h。在上述条件下,各菌株的原生质体释放量均可达 10^8 /ml以上。同时,菌株90-11的再生率可达20%,菌株WH-1和菌株5406的再生率则分别达15%以上。原生质体释放量和再生率均受溶菌酶浓度和酶解时间的影响。超出上述适宜条件,随着溶菌酶量的加大及酶解时间的延长,各菌株的原生质体释放量不再增加,甚至会下降。相应再生率则呈下降趋势。

2.2 原生质体保存条件对再生的影响

将各菌株原生质体制备液在-20℃下冻存,于不同时间取出,在30℃水浴中迅速解冻后测定再生率(表3),发现贮存2-3月时间内的原生质体再生率均呈下降趋势。菌株90-11、WH-1和5406的原生质体的相对再生率为:保存一个月时,82.3%、78.8%和73.2%;保存两个月时,69.3%、67.9%和61.3%。原生质体保存三个月则相对再生率下降幅度转大,菌株90-11和WH-1的相对再生率分别为44.2%和32.7%。

表3 -20℃冷藏对原生质体再生的影响

保存时间 (天)	90-11		WH-1		5406	
	再生率%	相对再生率%	再生率%	相对再生率%	再生率%	相对再生率%
0	21.5	100	15.6	100	14.2	100
7	18.5	86.0	13.7	87.8	12.4	87.3
14	16.6	77.2	13.8	88.5	12.9	90.8
30	17.7	82.3	12.3	78.8	10.4	73.2
60	14.9	69.3	10.6	67.9	8.7	61.3
90	9.5	44.2	5.1	32.7	NT*	NT

* NT:未测

2.3 不同组合的原生质体融合

融合试验结果见表4。在融合液涂皿再生20h后,添加混合抗生素液涂皿,直接检出具有双抗特性的融合子,表明菌株90-11和WH-1与链霉菌5406的融合频率均为 10^{-4} 。

表4 不同组合原生质体融合的比较

融合组合	选择性平板	选择性平板 (菌落数/ml)	非选择性平板 (菌落数/ml)	融合频率
90-11×5406	Str+Rif	3.3	2.54×10^4	1.30×10^{-4}
WH-1×5406	Thio+Rif	6.0	2.35×10^4	2.55×10^{-4}

原生质体融合和常规诱变育种一样,只有获得大量的融合子,才能从中筛选到所期望的优秀融合后代。一定数量的融合子需要靠多次的融合实验获得。每次实验制备新鲜的原生质体,会浪费大量药品,并使实验过程拉得很长。本实验证明,将用不完的原生质体立即在-20℃冰柜中速冻保存,可以延长它的使用期,至少在1-2月内使用仍可保持较高的再生率。这样,制备一次原生质体,即可用于多次融合,既节约药品又可以缩短获得大量融合子所需的时间。

(下转第325页)

型。因为同样的实验数据可以用不同的模型拟合,所得拟合结果也不尽相同。机理正确的模型可能由于过程噪声和观测噪声的干扰而拟合不佳。若是想得到一个经验公式,当然选取相关系数最大的模型(包括参数);若是建立一个机理模型,相关系数即使不是最大,但已达到较高的显著水平,仍应考虑接受。

3.3 数据的数量和分布的要求

关于参数估计的数据数量的要求,原则上有效数据越多越好。但是在一定的实验条件下,所得到的实验数据总是有限的,并且当数据的个数超过一定数量时,再增加数据对提高数据的统计意义并不大。一般地说,当数据的准确度较高时,数据可以少一些;反之,数据则要求多一些。此外,实验数据应在曲线的各段都有分布。在曲线的斜率变化较大的线段,数据点不宜稀疏,以便较好地反映曲线的特征。

参 考 文 献

- [1] Sparks, D.L., *Kinetics of Soil Chemical Processes*, Academic Press, San Diego, CA, 1989, 210 pp.
- [2] (美)夏天长著(熊光楞、李芳芸译),系统辨识,清华大学出版社,1983。
- [3] 侯克复编著,环境系统工程,北京理工大学出版社,1992。
- [4] 刘多森、曾志远编著,土壤和环境研究中的数学方法与建模,农业出版社,1987。
- [5] Zhang, S.M., Liu, D.S., Wang, Z.S. and Ma, X.F., *Ecological Modelling*, 1993, 70:115-125.
- [6] Liu, D.S., Li, Z.G., Wang, Z.S. and Pan, Y.H., *Ecological Modelling*, 1995, 82:193-198.
- [7] Wang, Z.S., Liu, D.S. and Zhang, S.M., *Pedosphere*, 1997, 7(1):9-14.
- [8] Wang, Z.S., Zhang, S.M. and Liu, D.S., *Pedosphere*, 1997, 7(2):119-126.
- [9] 刘树庆,土壤学报,1996,33(2):175-182。
- [10] 席少霖,赵凤治编著,最优化计算方法,上海科学技术出版社,1983。

☆☆

(上接第298页)

参 考 文 献

- [1] 华中农学院微生物教研室,农用抗生素5102的研究, I:产生菌的分类,微生物学报,1978,18(1):23-26。
- [2] 张声华、刘锦林、赵宏佐、王学文,农用抗生素5102的研究 II:5102-I号抗菌素第III组份的分离及鉴别,华中农学院学报,1981,(3):30-43。
- [3] 尹莘耘,抗菌素肥及其应用,北京:农业出版社,1966,1-20。
- [4] 周秀芬、周启,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,生物工程学报,1989,5(3):226-231。
- [5] 袁丽蓉,麦迪霉素产生菌——生长卡链霉菌原生质体融合的研究,抗生素,1983,8(6)。
- [6] 梁蓉芳、周启,农抗5102产生菌原生质体融合育种的研究 I.影响原生质体形成和再生的因素,华中农学院学报,1985,4(3):48-54。
- [7] 周东坡、平文祥,微生物原生质体融合,黑龙江科学技术出版社,1990,91-94。