

# 链霉菌原生质体种间融合提高细胞分裂素效价的研究

张靖溥\* 张震霖 尹莘耘

(中国农业科学院原子能利用研究所,北京)

本文报道粉红孢类群的泾阳链霉菌与淡紫灰链霉菌不液化亚种的原生质体种间融合重组的结果。利用单亲灭活和双亲株的遗传标记筛选细胞分裂素的融合子,融合率为  $10^{-4}$ — $10^{-2}$ 。在所得的融合菌株中, F1211 菌株的 CTK 效价为 292  $\mu\text{g/L}$ , F1613 的 CTK 效价为 857  $\mu\text{g/L}$ ,比低产原始亲株提高 2—7 倍,比高产亲株提高 0.3—3.0 倍。在电子显微镜下观察到融合过程。

**关键词** 原生质体融合;种间重组;细胞分裂素;泾阳链霉菌;淡紫灰链霉菌不液化亚种

原生质体融合是一项新的有效的遗传育种技术,在国内外已得到广泛应用。我们试用这项技术,选育细胞分裂素(Cytokinin, CTK)高产菌株。CTK 的生理作用主要是促进植物细胞分裂,在国际上已被誉为农业生产上很有潜力的激素之一,但目前 CTK 的生产主要依赖化学合成,成本较高,不可能大面积应用。利用微生物发酵生产 CTK 是一捷径,但首先要解决菌种问题。泾阳链霉菌<sup>[1]</sup> (*Streptomyces jingyangensis* Tao, 1978) (代号 5406 菌)是我室选育的产 CTK<sup>[2]</sup>(以玉米素和 2ip 为主)和某些抗菌素<sup>[3]</sup>的菌株,但效价均较低;淡紫灰链霉菌不液化亚种<sup>[4]</sup> (*Streptomyces lavendulae* subsp. *nonliquefaciens*, LN17) 为我室新开发菌株,CTK 效价较高,但抗逆性较差。将泾阳链霉菌和淡紫灰链霉菌不液化亚种进行种间原生质体融合,以期集中两菌之优点,本文报道实验的初步结果。

## 材料和 方法

### (一) 菌株

泾阳链霉菌菌株: A3 为原养型,链霉素抗性

(Str<sup>r</sup>), 氨苄青霉素抗性 (Amp<sup>r</sup>), 属粉红孢类群,为原始亲本; N-B11-2 株,由菌株 A3 经快中子照射所得组氨酸缺陷型 (his<sup>-</sup>), 链霉素抗性 (Str<sup>r</sup>), 氨苄青霉素抗性 (Amp<sup>r</sup>), 为直接亲本。

淡紫灰链霉菌不液化亚种菌株: LN17 为原养型,链霉素敏感 (Str<sup>s</sup>), 氨苄青霉素敏感 (Amp<sup>s</sup>), 属淡紫灰类链霉菌,为直接亲本菌株。

### (二) 培养基

完全培养基 (CM) 和基本培养基 (MM) 见参考文献[5]; Sm 培养基, P 培养基和 R1 培养基见文献[6]; 菌粉 2 号制剂培养基(%): 可溶性淀粉 2, 黄豆饼粉 2.5, 葡萄糖 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.04, NaCl 0.3, CaCO<sub>3</sub> 0.3, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3, pH7.0—7.5; 选择培养基: MM + Str + Amp, MM + Str, MM + Amp。

### (三) 亲本菌株的遗传标记和原生质体制备

两亲株分别经单菌落分离纯化后用高温培养<sup>[5]</sup>或辐射处理<sup>[9]</sup>以消除染色体外的遗传因子,并用凝胶电泳法检测质粒消除株的 DNA<sup>[7]</sup>,测定质粒消除株的抗药性标记,通过诱变获得营养缺陷型。

原生质体制备,按文献[6,10]。但需做预备

本文于 1987 年 11 月 25 日收到。

本所四室电镜组在电镜制片和观察方面给予很大支持。

\* 现在中国科学院生物物理研究所工作。

实验,以选定合适的甘氨酸、SDS 和溶菌酶的浓度。

#### (四) 原生质体热灭活

按文献[10]进行。

#### (五) 原生质体融合与再生

参照 Hopwood<sup>[11]</sup> 和郑幼霞<sup>[12]</sup> 的报道。融合前,一亲株的原生质体要先经高温灭活,原生质体浓度不低于  $10^7$  个/ml, 同时进行包括灭活原生质体和非灭活原生质体的再生实验,分别按下式计算再生率。

$$\text{再生率} = \frac{\text{Pm 稀释后的再生菌落数} - \text{低渗处理的再生菌落数}}{\text{原生质体形成数}}$$

$\times 100\%$

#### (六) 融合重组子的检测

主要采用间接法<sup>[13]</sup>。将在 R1 长出的菌落,对应点种到 CM 和三种选择培养基上,28℃ 培养 4—6 天,将在选择培养基生长的菌落转接传代,纯化后,进一步鉴定,测其 CTK 效价。并根据 CM 和选择培养基上生长的菌落计算融合率。

#### (七) CTK 组份提取和效价测定

菌株于 28℃ 摇床培养 72h, 去菌丝,滤液用盐酸酸化,冰箱过夜,去沉淀,滤液于 55℃ 减压浓缩,用 NaOH 调 pH8.0—8.2, 用水饱和正丁醇按 1:1 体积萃取三次,醇相减压蒸干,用少量 35% 乙醇洗出,进行薄层层析分离及效价测定<sup>[14]</sup>。

薄层层析扫描: 扫描波长 265nm, 参比波长 350nm。仪器: 岛津 CS-910 双波长薄层扫描仪。

#### (八) 抑菌活性的测定

用钢圈法测定发酵滤液和 CTK 粗提液的抑菌作用,指示菌为大肠杆菌 517(*E. coli* 517) 枯草杆菌 (*B. Subtilis*) 6633, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 深红酵母 AS 2.282 (*Rhodotorula rubra* AS 2.282)。

#### (九) 融合的电镜制片

参照文献 [6]。

## 结 果

### (一) 原生质体的形成

1. 甘氨酸浓度: 甘氨酸可增加菌丝体

对溶菌酶的敏感性,促进原生质体的形成。这在本实验中成效显著: 加入甘氨酸,原生质体的形成可提前 3—4h, 且其数量提高 10—100 倍, 而用酶量减少(表 1), 这与文献的报道<sup>[13,15-17]</sup> 是一致的。但甘氨酸也抑制菌丝的生长,使菌丝生物量锐减。对 LN17 菌株, 1% 甘氨酸使菌丝生物量减少一半, 3% 甘氨酸几乎使菌丝不能生长, 故采用 0.5% 的浓度。同理,对 N-B11-2 菌株则用 1% 的浓度。

2. 溶菌酶浓度: 粉红孢类的 N-B11-2 菌丝在 4mg/ml 溶菌酶时,原生质体释放量接近最高,而淡紫灰类的 LN17 菌在 1.8 mg/ml 时就接近最高值。继续加大酶量,原生质体释放高峰的时间提前,并不显著增加原生质体量。两菌株对溶菌酶敏感性的差异可能与其菌丝体细胞壁的结构状态有关。

3. 十二烷基硫酸钠(SDS)的浓度: 用水处理原生质体 2—3h 后,在显微镜下仍可见相当量的原生质体,改用 SDS 水溶液,但 SDS 对 N-B11-2 的抑制较强,0.01% SDS 抑制率达 1%, 而对 LN17 菌的抑制较小,故采用 0.01% SDS 水溶液裂解原生质体,效果较好。

### (二) 原生质体融合与再生

将经融合处理的原生质体,进行超薄切片,观察融合过程(图 1),可见原生质体彼此靠近,膜与膜先在一点接触,融膜,细胞质沟通,逐渐混合,此时,两“核”仍相对独立,由各自的胞质包围,随细胞质的互融,细胞的染色质逐渐接近,直至“核融”。整个过程与 Hopwood<sup>[13]</sup> 等的描述大致相同。

两亲株的原生质体的再生同步性较好,一般培养 4—5 天即可出现 95% 以上的再生菌落,再生率与菌丝培养时有无甘氨酸与培养时间有关(表 1),未加甘氨酸培养 24h 的菌丝,其原生质体的再生率比

表 1 原生质体的形成及再生频率

Table 1 The yield of protoplasts and regeneration frequency

| 菌株 Strain  | LN17  |       | N-B11-2 |       |
|--|-------|-------|---------|-------|
|  | 24    | 48*   | 24      | 48*   |
| 菌丝培养时间(小时) Mycelia age (h)                       |       |       |         |       |
| 溶菌酶浓度 Lysozyme's concentration (mg/ml)           | 5     | 2—3   | 5       | 4—5   |
| 酶解时间 Incubation time (min)                       | 300   | 60—90 | 300     | 60—90 |
| 原生质体总数 Total No. of protoplast ( $\times 10^7$ ) | 3     | 520   | 5.9     | 42    |
| 再生率 Frequency of regeneration (%)                | 41.14 | 0.133 | 16.7    | 0.141 |

实验中每种菌丝发酵液取 10ml。

10ml mycelium volume of each strain was tested.

\* 在 Sm 中加入甘氨酸。

\* Added glycine in the Sm medium.

加甘氨酸培养 48h 的菌丝的再生率高两个数量级。而加入甘氨酸培养 24h 的发酵液,菌丝生物量极少,无法进行实验。灭活原生质体的再生率为零。

### (三) 融合子的检出

将热灭活的 LN17 株原生质体与未灭活的 N-B11-2 株原生质体融合,热灭活的 N-B11-2 株原生质体与未灭活的 LN17 株原生质体融合,在融合时可除去一方亲

本的再生菌落,再生后,只对活亲本的标记进行初筛即可,复筛时仍根据两亲株的遗传标记选择融合子。由此选到 103 株融合子,进行 CTK 效价的测定的结果如表 2。灭活亲株 N-B11-2 的融合率比灭活 LN17 亲株的融合率低 1—2 个数量级,亲本菌株的回复突变在  $10^{-7}$ — $10^{-8}$  以下(表 3),故可排除亲株回变的干扰。

### (四) 细胞分裂素的提取和效价测定

CTK 为一类腺嘌呤衍生物,在紫外区 265—275nm 有光吸收;其溶解特性为弱酸醇溶性,因此,可用水饱和正丁醇萃取。以 CTK 标准品反式玉米素 (t-Zeatin, t-Z) 和 6-(3-甲基-2-丁烯基氨基)嘌呤 (2ip) 为对照,萃取物经薄层层析分离、薄层扫描和紫外检测仪检测,可知, t-Z 的  $R_f$  在 0.68—0.76, 2ip 的  $R_f$  在 0.75—0.84 之间,在与其相应位置上,所测菌株发酵液的萃取液也有斑点存在, F1211、F1613、F1611 是得到的融合子中 CTK 效价较高的菌株; F49 为灭活 LN17 菌原生质体融合得到的融合子代表株。亲株 N-B11-2 和 F1211、F1611、F49、F1613 只含有玉米素,而亲株 LN17 则含有 Z 和 2ip 两种 CTK。



图 1 原生质体正在融合 ( $\times 20\ 000$ )  
Fig. 1 Protoplast fusing ( $\times 20\ 000$ )

表 2 原生质体融合结果  
Table 2 Results of protoplast fusion

|   | 菌落数 No. of colony |               | 融合率 Fusion frequency |                      |                      |
|---|-------------------|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|   | N-B11-2*×LN17     | N-B11-2×LN17* | Total                | N-B11-2*×LN17        | N-B11-2×LN17*        |
| 总菌落 Total colonies                              | 35331             | 6316          | 41647                |                      |                      |
| 融合子表型<br>Phenotype of fusant                    |                   |               |                      |                      |                      |
| Prototroph, str <sup>r</sup> ,                  | 11                | 44            | 55                   | $3.1 \times 10^{-4}$ | $7.0 \times 10^{-3}$ |
| Prototroph, str <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup> | 7                 | 27            | 34                   | $2.0 \times 10^{-4}$ | $4.3 \times 10^{-3}$ |
| Prototroph, Amp <sup>r</sup>                    | /                 | 14            | 14                   | /                    | $2.2 \times 10^{-3}$ |
| Total   | 18                | 85            | 103                  | $5.1 \times 10^{-4}$ | $1.4 \times 10^{-2}$ |

\* 该菌的原生质体被高温杀死。

\* The protoplast was killed by high temperature.

表 3 亲本菌株自发突变频率  
Table 3 Spontaneous mutation frequency of parents

| 表型 Phenotype                        | 频率* Frequency*        |                       |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                     | Strain LN17           | Strain N-B11-2        |
| Amp <sup>r</sup>                    | $<5.6 \times 10^{-8}$ | /                     |
| Str <sup>r</sup>                    | $<5.6 \times 10^{-8}$ | /                     |
| Amp <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup> | $<4.5 \times 10^{-8}$ | /                     |
| Prototroph                          | /                     | $<2.5 \times 10^{-7}$ |

\* 对 LN17 菌株为自发突变率;对 N-B11-2 菌株为自发回复突变率。

\* Spontaneous mutation frequency for strain LN17; Spontaneous reversion frequency for strain N-B11-2.

将薄板上与 CTK 对应的斑点刮下,用尾穗苋 (*Amaranthus candatus* L.) 苋红素 (Betacyanin) 合成法测定 CTK 效价<sup>[14]</sup>,用激动素 (kinetin, KT, 人工合成的 CTK) 做标准曲线,即可定量测得样品 CTK 相当于 KT 的效价,结果见表 4。

由表 4 可知,融合子 F1211 和 F1613 菌株发酵液的 CTK 效价比亲本菌株大幅度提高, F1211 为  $292.2 \mu\text{g/L}$ , F1613 为  $857.4 \mu\text{g/L}$ , F49 为  $90.8 \mu\text{g/L}$ , 直接亲株

N-B-11-2 株为  $77.7 \mu\text{g/L}$ , LN17 株为  $226.9 \mu\text{g/L}$ , 原始亲株 A3 为  $102.2 \mu\text{g/L}$ , 生产菌株 R2 为  $54.7 \mu\text{g/L}$ 。将 15 次 CTK 效价测定的结果进行方差分析,可知, F1211、F1613 与亲株之间的 CTK 效价差异非常显著 ( $p < 0.01$ )。两种灭活方式得到的融合子之间, CTK 效价差异也非常显著 ( $p < 0.01$ ), 这提示通过灭活不同的亲株原生质体进行融合, 选育 CTK 产量提高的融合子有一定的意义。直接亲本 N-B11-2 株与 LN17 株之间的效价差异也显著 ( $p < 0.05$ )。

### (五) 抑菌活性

以大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌和深红酵母为指示菌, 检测融合子和亲株发酵液及其醇萃取液的抑菌作用。发现 F1211 株对上述三种原核细菌均有明显的抑制作用, 这是亲株和其它融合子所没有的特性, 并且其发酵液和醇萃取液的抑菌作用一致, 说明醇萃取液中除 CTK 外, 还含有醇溶性抗菌物质; 该抗菌物质对革兰氏阳性和阴性原核细菌均有抑菌活性, 对真核的红酵母菌无作用 (表 5、图

表 4 融合子与亲株菌的 CTK 效价和特性的比较

Table 4 Comparison of CTK valence and characteristics between fusants and parents

| 菌株 Strains                | 表型 Phenotype   | CTK 总效价<br>Total valence<br>of CTK<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 融合子与亲株的总效价比<br>Ratio of total valence of fusant/<br>parent |        |      |      | 菌落颜色<br>Color of colony  |
|---------------------------|--|---|--|--------|------|------|--------------------------|
|                           |  |   | F/N-<br>B11-2  | F/LN17 | F/A3 | F/R2 |                          |
| 融合子 Fusants               |  |   |  |        |      |      |                          |
| F1211*                    | Prototroph, Str <sup>r</sup> ,<br>Amp <sup>r</sup>     | 292.2   | 3.76   | 1.29   | 2.86 | 5.3  | 淡紫灰<br>Light violet gray |
| F1613*                    | Prototroph, Str <sup>r</sup> ,<br>Amp <sup>r</sup>     | 857.4   | 11.0   | 3.78   | 8.39 | 15.7 | 淡紫灰<br>Light violet gray |
| F49                       | Prototroph, Str <sup>r</sup> ,<br>Amp <sup>r</sup>     | 90.8  | 1.17   | 0.4    | 0.89 | 1.66 | 粉红 Pink                  |
| 直接亲株<br>Immediate parents |  |   |  |        |      |      | 白色 White                 |
| N-B11-2                   | his <sup>-</sup> , Str <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup> | 77.7  |  |        |      |      | 淡紫灰 Light<br>violet gray |
| LN17                      | Prototroph, Str <sup>r</sup> ,<br>Amp <sup>r</sup>     | 226.9   |  |        |      |      |                          |
| 原始亲株<br>Original parent   |  |   |  |        |      |      |                          |
| A3                        | Prototroph, Str <sup>r</sup> ,<br>Amp <sup>r</sup>     | 102.2   |  |        |      |      | 粉红 Pink                  |
| 生产菌株<br>Production strain |  |   |  |        |      |      |                          |
| R2                        | Prototroph, Str <sup>r</sup> ,<br>Amp <sup>r</sup>     | 54.7  |  |        |      |      | 粉红 Pink                  |

\* 融合子与亲本菌株效价的差异  $P < 0.01$ 。\*  $P < 0.01$  between the valence of fusant and parents.

表 5 融合子和亲株的抑菌作用

Table 5 Bacteriostatic action of fusants and parents

| 菌株 Strains | 抑菌圈直径(毫米) Diameters of bacteriostatic ring(mm) |                                  |   |                                  |
|------------|--|----------------------------------|---|----------------------------------|
|            | 大肠杆菌 <i>E. coli</i>                            | 枯草杆菌<br><i>Bacillus subtilis</i> | 金黄色葡萄球菌<br><i>Staphylococcus aureus</i> | 深红酵母<br><i>Rhodotorula rubra</i> |
| A3         | 0  | 26*                              | 0                                       | 0                                |
| N-B11-2    | 0  | 16*                              | 0                                       | 0                                |
| LN17       | 6.5  | 6.5                              | 0                                       | 0                                |
| F1211      | 15   | 17.1                             | 26                                      | 0                                |
| F1613      | 6.5  | 6.5                              | 0                                       | 0                                |
| F49        | 6.5  | 6.5                              | 0                                       | 0                                |

\* 在抑菌圈上长出弱次生菌。

\* Secondary bacterium grow weakly on the bacteriostatic ring.

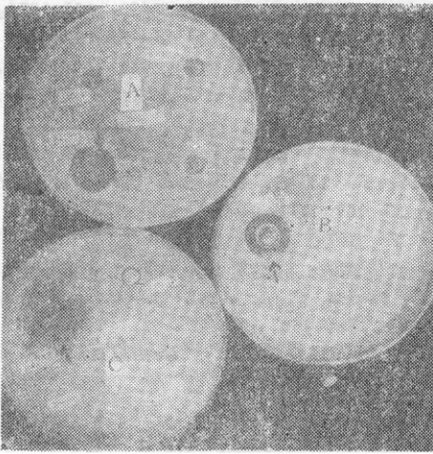


图2 F1211 菌株的抑菌活性  
Fig. 2 Bacteriostatic activity of strain F1211

A. *E. coli* as marker; B. *Bacillus subtilis*;  
C. *Staphylococcus aureus*; ↑ Bacteriostatic ring of strain F1211

2)。

## 讨 论

1. 原生质体形成: 氨酸对菌丝生长和原生质体的形成有很大的影响。本实验所用两种链霉菌在含甘氨酸的培养基上, 24h 时菌丝量极少, 无法制备原生质体; 48h 的菌丝比较合适; 如若不加甘氨酸, 48h 的菌丝即使与溶菌酶作用 10h, 也不能释放足够的原生质体。这说明甘氨酸对原生质体形成有显著的促进作用, 可能是甘氨酸干扰了正常细胞壁的结构而易于被溶菌酶作用的结果。

两亲株在原生质体形成的难易和用酶量上均有明显的不同。在光学显微镜下, 可见两亲株的菌丝状态有差异, LN17 菌丝呈分散短片段, N-B11-2 菌丝呈交织团状。还观察到这两种菌的原生质体形成是从菌丝末端逐个释放, 因此菌丝末端数暴露在酶液中愈多, 愈易接触溶菌酶, 原生质体释放量也就愈大, LN17 菌因片段小, 末端多, 故原生质体的释放比 N-B11-2 菌快

而多。

2. 原生质体再生: 考察 24h 和 48h 菌龄的菌丝形成原生质体的再生能力, 显然年轻菌丝的原生质体比年长的再生能力强得多, 但也不排除甘氨酸对原生质体再生能力有损害的可能。

在本实验中, 原生质体在 R1m 上再生菌落均不易生成孢子, 只有将菌落转移到正常培养基上, 菌落形态才回复正常, 形成孢子堆, 因此筛选时不能用影印法, 必须对应点种, 工作量很大且易遗失融合子。

3. 单亲灭活与融合重组的定向性: 上述结果表明, 灭活低 CTK 效价亲株 N-B11-2 得到的融合子, 如 F1211、F1613, 效价高于高效价的亲株 LN17, 而灭活高效价亲株 LN17 得到的融合子如 F49 效价高于亲株 N-B11-2 但低于亲株 LN17。另外, 融合子菌落主要表现活亲本的特征, 这提示通过单亲灭活得到的融合子, 是以活亲株为受体, 灭活亲本仅仅做为异源基因片段的供体。故融合子的特征主要是活亲株菌种的特征, 这似乎使融合具有一定的定向性, 对于融合亲株的选择具有一定指导意义。

4. 单亲灭活提高融合子的检出率: 以往报道的种间融合重组率多在  $10^{-3}$ — $10^{-7}$ [12,18,19], 本实验的融合率为  $10^{-1}$ — $10^{-2}$ , 这可能与融合亲株原生质体的处理有关。单亲热灭活使一方亲株的原生质体不能再生, 因此, 融合子在再生菌落中的比例提高, 表现为融合重组率较高, 但实际上可能是提高了融合子的检出率。

5. 融合子可产生亲本没有的新性状: 融合子 F1211 为单标记融合的产物, 其菌落特征很象 LN17, 但它对原核菌较强的抑菌作用却是 LN17 菌所不具备的, 即使是抗逆性较强的 N-B11-2 亲株也远不如它, 这种抑菌物质有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 陶天申等: 微生物学报, 19(3): 249—254, 1979。
- [2] 辽宁林土所: 微生物学报, 15(3): 217, 1975。
- [3] 尹莘耘等: 抗生素肥及其应用, 农业出版社, 北京, p. 18—20; 23—42; 120; 165; 1966。
- [4] 张靖溥等: 微生物学报, 27(4): 377—379, 1987。
- [5] 冯清平、葛瑞昌: 微生物应用技术, 甘肃人民出版社, 兰州, p. 202, 1984。
- [6] Okanishi, M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 80: 389—400, 1974。
- [7] Kado, C. I. et al.: *J. Bacteriol.*, 145(3): 1365—1373, 1981。
- [8] 薛禹谷等: 微生物学报, 18(3): 195, 1978。
- [9] 焦瑞身: 抗生素, 5(4): 45—54, 1980。
- [10] 李焕葵等: 抗生素, 9(6): 445—449, 1984。
- [11] Hopwood, D. A. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 111: 137—143, 1979。
- [12] 郑劲豪等: 生物工程学报, 1(3): 32—37, 1985。
- [13] Hopwood, D. A.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 35: 237—272, 1981。
- [14] 丁 静等: 植物生理学通讯, 2: 27—39, 1979。
- [15] 袁丽蓉等: 抗生素, 8(6): 380—387, 1983。
- [16] Fawcett, P. A. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 79: 239—256, 1973。
- [17] Richard, H. B.: *J. Gen. Microbiol.*, 107: 93—102, 1978。
- [18] 张伯生: 抗生素, 11(4): 376—379, 1986。
- [19] 陈亚平等: 抗生素, 11(3): 253—261, 1986。

## RESEARCH ON INCREASING CYTOKININ'S VALENCE OF *STREPTOMYCES* BY INTERSPECIFIC PROTOPLAST FUSION

Zhang Jingpu    Zhang Zhenlin    Yin Xinyun

(Institute of Utilization of Atomic Energy, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing)

This paper reports the results of interspecific protoplast fusion and recombination between *Streptomyces jingyangensis* strain N-B11-2 (*his*<sup>-</sup>, *Str*<sup>r</sup>, *Amp*<sup>r</sup>) and *S. lavendulae* subsp. *nonliquefaciens* strain LN17 (prototroph, *Str*<sup>r</sup>, *Amp*<sup>r</sup>), one of the parents was killed by heating. The frequency of fusion is about  $10^{-4}$ — $10^{-2}$ . The frequency of regeneration is 16.7—41.1% in 24 h in Sm and 0.1% in 48 h in glycine-contained Sm. The CTK valence of strain F1211 is 292  $\mu\text{g}$  per litre of fermentation broth; strain F1613 is 857  $\mu\text{g}$  per

litre. The values are 2—7 fold higher than that of their low activity parent and 0.3—3.0 fold higher than that of their high activity parent. The process of fusion was observed by electron microscope.

### Key words

Protoplast fusion; interspecific recombination; cytokinin; *Streptomyces jingyangensis*; *Streptomyces lavendulae* subsp. *nonliquefaciens*