

赤霉素产生菌——藤仓赤霉菌融合重组的研究

李武军 郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘要 以一对营养互补的缺陷型突变株作为亲本,酶法去除细胞壁制成原生质体,以等量相混,用 30% PEG 4000 诱导融合,在最低营养再生培养基上直接选择原养型融合重组子,重组频率约为 10^{-7} ,同时产生一定数量的不稳定异核体,频率约为 10^{-7} — 10^{-6} 。融合重组导致色素产生和菌丝形态及赤霉素产生能力的多种变异。融合重组子中赤霉素产量的正变率为 15.3%。其中 RN2 和 RG14 菌株的赤霉素产量比原养型出发菌株 207 提高 25% 以上。

关键词 藤仓赤霉,原生质体融合,重组子

藤仓赤霉菌 (*Gibberella fujikuroi*) 作为真菌中的半知菌,其无性阶段称之为串珠镰孢 (*Fusarium moniliforme*)。它所产生的植物激素——赤霉素是一种天然的植物生长调节剂,它对植物生长具有多种生物功能,可以调节植物生根、发芽和结果等过程,能刺激水稻、棉花和麻类等作物的生长发育。因此被广泛使用于杂交水稻制种、柑桔保果、棉花保铃、蔬菜及幼林的生长,对于促进农业生产,特别是粮食生产有很大的经济效益及社会效益。赤霉素的生产在国际国内已形成相当大的工业规模。有不少研究工作者致力于产生菌的遗传改良,用不同的化学物理诱变剂处理,分离了一些形态和生化变种,在一定程度上影响赤霉素的生产能力^[1-4],我国对赤霉素产生菌的改良主要在 70 年代进行,曾得到菌号为 4303 的高产变种^[5],并成为迄今工业上应用的生产菌株。4303 菌株丧失了产孢子能力,只长成多细胞菌丝体,这对菌种的继续改良带来了技术上的困难。1990 年我们建立了藤仓赤霉菌的原生质体形成、再生、及诱变技术,取得了良好的效果,得到的 207 菌株其赤霉素产量较之出发菌株提高了 68.1%^[6]。此后进一步开展 207 菌株原生质体融合重组的研究。本文主要报道原生质体或沉没孢子经诱变处理产生营养缺陷型突变株、突变株原生质体的融合重组以及融合重组过程的分析。

1 材料和方法

1.1 菌株

赤霉素产生菌藤仓赤霉菌 (*Gibberella fujikuroi*) 207 菌株由本实验室经原生质体育种得到的高产菌株。

1.2 培养基

斜面培养基 PDA, 菌丝生长培养基 G, 丰富营养培养基 CM, 最低营养培养基 MM 及原生质体再生培养基 CMS, MMS 及赤霉素发酵培养基均同参考文献[6];营养缺陷型

王 锋同志参加技术工作。

本文于 1994 年 1 月 28 日收到。

变种菌丝生长培养基 G1(%)：酵母膏 0.5, 土豆汁 20, 蔗糖 2, 糊精 2.5, 醋酸铵 4.5, 甘氨酸 2, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1。

1.3 酶和试剂

纤维素酶 EA₈₆₇ 由本所自制, 溶菌酶为中国科学院生物化学研究所东风生化试剂厂生产, 蜗牛酶为中国科学院东方仪器设备公司生化部产品, 二硫苏糖醇 (DTT, Serva), NTG (瑞士 Fluka)。

1.4 沉没孢子(小孢子)的制备

207 菌株斜面菌丝接种到 PD 液体摇瓶中, 28°C 旋转培养 4d(200r/min) 取出, 用一层无菌纱布过滤去除菌丝体, 滤液离心沉淀, 倾去上清液, 用 PBS 洗下沉淀即得小孢子悬液。

1.5 诱变

NTG: NTG 用蒸馏水新鲜配制成 1mg/ml, 取适当体积加入原生质体悬液(密度为 $10^7/\text{ml}$), 使成所需工作浓度。

UV: 小孢子悬液 4ml 移入平皿中, 置紫光灯下照射 (2537 Å, 40W, 25 cm), 间隔不同时间取样。

经以上处理并经适当稀释的原生质体/小孢子悬液, 分别涂布在 CMS/PDA 平板上, 使长成单菌落。在这些存活菌落中选择营养缺陷型突变种, 凡是只能在 CM 中生长而不能在 MM 中生长的菌落即为所需的变种。

1.6 原生质体融合

将作为亲本的一对营养互补缺陷变种分别制成原生质体。缺陷变种的原生质体制备方法与原养型出发菌株略有不同。首先用 CM 代替 PDA 作为斜面培养基; 用 G1 代替 G 作为菌丝生长培养基; 溶解细胞壁的混合酶液中需同时加入 0.4% 的蜗牛酶。这样就可以得到高产优质的原生质体制剂了。二亲本原生质体各取 1ml 相混离心, 经 PBS 洗涤后以 30% PEG 4000 助融 (0.01 mol/L CaCl_2 , 0.05 mol/L 甘氨酸, pH 7.5), 立即充分混匀, 30°C 保温 5min, 然后加入 6ml PBS, pH 7.4, 离心, 洗涤, 倾去上清液, 以 1ml PBS 混悬, 涂布在 MMS 再生平板上, 28°C 保温, 直接检出重组子。

1.7 营养缺陷标记的鉴别

按生长谱法鉴别缺陷变种的营养性状^[7]。

2 结果和讨论

2.1 营养缺陷变种的制备

将 207 菌株按材料和方法中介绍的操作程序分别制成原生质体及小孢子, 以 NTG 处理原生质体, UV 照射小孢子。实验结果显示, NTG 处理原生质体, 随着剂量增大, 死亡率提高, 当 NTG 剂量为 100、200 和 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 其致死率分别为 26.9、45.4 和 62.2%。小孢子对 UV 照射反应比较敏感, 5min 致死率即达到 99.989%。从处理后的存活菌落中分别鉴别营养缺陷突变株, 结果显示原生质体以 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NTG 处理后, 从 848 个试验的再生菌落中得到了 24 株营养缺陷变种, 突变率为 2.8%, 而从小孢子经 UV 照射 5min 处理后生长的单菌落中, 试验了 336 个存活菌落, 只得到一个营养突变株, 其

突变率为 0.297%。说明藤仓赤霉菌营养缺陷突变的发生与致死率的高低无直接的关系, 看来诱变剂的特性是首要的因素。这里也同样显示 NTG 对藤仓赤霉菌具有良好的诱变效应; 诱变菌株的材料也十分重要, 原生质体失去了细胞壁的保护, 较之有坚实外壁的小孢子, 诱变剂更易于透入, 而且小孢子处于休眠状态, 必然对外界的作用具有一定的抗性。

得到的营养突变种多为氨基酸单缺陷, 包括 N44(Lys⁻)、N38(Met⁻) 和 N46(Leu⁻) 等。

在营养缺陷变种的选择方法上, 采用过滤富集法^[6]是行之有效的。用常规方法从经过诱变处理的再生菌落中随机挑取 520 个单菌, 经试验没有能鉴别出一个缺陷型突变株, 但采用过滤富集法, 试验过的 848 个再生单菌中, 得到了 24 个缺陷型突变株, 工作效率得到明显提高。

2.2 原生质体融合

关于藤仓赤霉菌原生质体融合至今未见报道。

取营养互补的一对营养缺陷型变种, N44(Lys⁻), N38(Met⁻) 分别制成原生质体作为亲本, 参考其它真菌的融合方法^[9]进行藤仓赤霉菌的融合试验。按材料和方法栏所描述的操作程序, 将二亲本原生质体等量混合, 30% PEG 4000 诱导融合后, 融合液涂布在 MMS 再生平板上, 28℃保温过程中观察到平板上出现了不同类型的菌落。根据对它们各自生长习性的进一步了解, 揭示其不同的遗传背景, 在 MMS 平板上最早出现的少数菌落, 发育正常, 菌落致密, 在 MM 培养基上传代稳定, 这是缺陷型亲本通过融合发生基因交换而产生的原养型重组子; 另外还有一类数量较大、均匀分散、菌丝稀薄的小菌落(直径约 2mm), 为了解这类菌落的性质, 先将它们移入 CM 平板, 待生长好后, 再分别依次点种到 MM、MM + lys 和 MM + met 的平板上, 一共试验了 156 个小菌落, 结果显示其中有 39 个菌落既能在 MM + lys, 又能在 MM + met 平板上生长, 表明它们系二亲本在融合过程中形成的不稳定异核体, 当移入 CM 平板上生长时即分离成 N44、N38 二亲本型, 其频率约为 10⁻⁵—10⁻⁶; 有 3 个菌落表现为在 MM 平板上生长良好的原养型, 这显然是由于一些不稳定异核体在 CM 中生长时细胞核分裂复制过程中发生继发的基因交换和重组事件所致, 其机率是很低的, 绝大部分小菌落估计可能是缺陷型亲本在混合培养中少量营养互喂的结果。表 1 所列的结果表明, 原生质体悬液中加入 30% PEG 4000 诱导融合的时间宜在 5min 之内, 继续延长至 10min 和 15min 则不再有重组子产生, 这可能反映 PEG 对原生质体的毒害作用。

表 1 藤仓赤霉菌的融合重组

Table 1 Fused recombination of *G. fujikuroi*

融和时间 Fusion time (min)	原生质体总数 No. of total protoplast	重组子数 No. of recombinants	重组频率 Recombination frequency
1	3×10 ⁷	3	1.0×10 ⁻⁷
5	3×10 ⁷	11	3.7×10 ⁻⁷
10	3×10 ⁷	0	
15	3×10 ⁷	0	

2.3 融合重组子产生赤霉素能力的变异

融合重组诱发藤仓赤霉菌的突变类型是多种多样的,对数十个原养型重组子作了仔细观察并进行比较,发现它们之间有色素及菌丝形态等的外观差异,有生长速度的差异以及赤霉素产生能力的差异。通过摇瓶发酵及对其产物的分析,显示融合重组子中有 15.3% 的菌株发生了赤霉素产量的正突变,有 53.1% 的菌株则为负突变。融合重组子 RN2 菌株及 RG14 的赤霉素产量比原养型出发菌株 207 提高 25% 以上。

参 考 文 献

- [1] Bearder J R, MacMillan J, Weis C M *et al.* *Phytochemistry*, 1974, 13: 914—917.
- [2] Erokhina L I. *Genetika*, 1969, 5: 143—147.
- [3] Erokhina L I, Efremov B D. *Genetika*, 1970, 6: 170—172.
- [4] Phinney B O, Spector C. *Ann N Y Acad Sci*, 1983, 144: 204—210.
- [5] 上海九二〇菌种选育协作组. 微生物学术育种讨论会文集(研究报告). 北京: 科学出版社, 1975, 61.
- [6] 李武军,郑幼霞,王洪洲,等. 真菌学报, 1992, 11(3): 221—228.
- [7] Sermonti G. *Genetics of Antibiotic-producing Microorganisms*. London: Wiley-interscience, 1969. 55—72.
- [8] 赵人俊,张益葵,郑幼霞. 遗传, 1981, 3(4): 6—8.
- [9] Anne J H, Peberdy J F. *J Gen Microbiol*, 1976, 92: 314—417.

STUDIES ON FUSED RECOMBINATION OF *GIBBERELLA FUJIKUROI*—GIBBERELLIN-PRODUCING STRAIN

Li Wujun Zheng Youxia

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

Abstract A pair of nutrient complementary auxotrophic mutants were used as fusion parents. Their protoplasts were prepared enzymatically and PEG4000 was used as fusion agent. The prototrophic recombinants were selected directly on the minimal regeneration medium. The recombination frequency was about 10^{-7} . Some unstable heterocaryons were occurred and the frequency was about 10^{-5} — 10^{-6} . Mutation of pigment, hyphae morphology and gibberellin production were induced through the fused recombination. The positive mutation, negative mutation of gibberellin yield among the recombinants were 15.3% and 53.1% respectively. Gibberellin yields of recombinants signed RN2 and RG14 were over 25% than that of the prototrophic parent 207 strain.

Key words *Gibberella fujikuroi*, Protoplast fusion, Recombinants