

原生质体融合提高农抗武夷菌素的效价*

曾洪梅 张震霖 石义萍 林德浙

(中国农业科学院植物保护研究所 北京 100094)

摘要 从农抗武夷菌素产生菌不吸水链霉菌武夷变种菌株 Co-N-31 诱变获得两个突变株 M35(Leu⁻, 孢子颜色灰色)和 M46(Ser⁻, 孢子颜色灰白色), 并以此两突变株为直接亲本在 25% PEG1000 诱导下进行种内原生质体融合。M35 和 M46 原生质体再生率分别为 3.72% 和 0.248%, 重组频率为 55.20%。采用间接法选择营养标记互补的稳定的原养型重组子, 并从中获得一株高产菌株 F31-24, 其效价比原始亲本 Co-N-31 提高了 82%。薄层层析结果表明, 菌株 F31-24 和 Co-N-31 的发酵产物在 Rf 值为 0.50 和 0.26 处均有斑点, 但含量有异。测定斑点生物活性证明其均有抑菌活性。温室试验表明, 菌株 F31-24 发酵产物对小麦白粉病的防治效果优于菌株 Co-N-31。

关键词 原生质体融合, 武夷菌素, 效价

农用抗生素武夷菌素是一种广谱、高效、无公害的抗真菌生物农药, 它由不吸水链霉菌武夷变种 (*Streptomyces ahyscopicus* var. *wuyiensis*)^[1] 产生, 对露地、保护地蔬菜病害有着极明显的防治效果, 同时对果树及粮食作物病害也有一定防治效果。武夷菌素粗品含有 A、B 两个组分, 武夷菌素 A 为核苷类抗生素。药效对比及示范试验表明, 武夷菌素对黄瓜白粉病^[2] 和蕃茄叶霉病的防治效果分别优于或相当于化学农药粉锈宁和多菌灵, 且由于其无污染, 有着广泛的应用前景。但目前武夷菌素产生菌的效价偏低, 对工业生产、推广和使用不利, 用常规方法诱变武夷菌素产生菌效价提高的幅度又不大, 需用其他方法来提高武夷菌素产生菌的效价。

链霉菌原生质体融合是 70 年代后期发展起来的一种较为成熟的生物技术^[3], 广泛用于提高抗生素的单位产量^[4], 改变生物合成抗生素的组分^[5] 及获得新代谢产物^[6] 等方面。在农抗方面, 也已用于农抗庆丰霉素^[6]、农抗 5102^[7] 等的研究中。作者将武夷菌素产生菌 Co-N-31 菌株作为原始菌株获得两株遗传标记互补的营养缺陷型 M35 (Leu⁻, 孢子颜色灰色) 和 M46 (Ser⁻, 孢子颜色灰白色), 并以此二突变株为亲本进行种内原生质体融合。现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 菌株

不吸水链霉菌武夷变种 (*S. ahyscopicus* var. *wuyiensis*) 菌株 Co-N-31: 本室从土壤中分离得到再经 ⁶⁰Co γ 射线和中子照射获得; 不吸水链霉菌武夷变种突变株 M35

* 北京市自然科学基金资助项目。

本文于 1994 年 7 月 6 日收到。

(Leu⁻, 孢子颜色灰色)和 M46(Ser⁻, 孢子颜色灰白色): 由原养型的菌株 Co-N-31 经 UV 和 LiCl 复合诱变获得, 用作融合用直接亲本; 深红酵母 (*Rhodotorula rubra*) AS 2.282: 本室保存, 武夷菌素生物效价测定用指示菌; 小麦白粉病菌 (*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*): 由本所白粉病组提供。

1.2 培养基

1.2.1 完全培养基 (CM): 酵母膏 10 g, 葡萄糖 10 g, 琼脂 20 g, 水 1000 ml, pH 7.2—7.4。

1.2.2 基本培养基 (MM): L-天冬酰胺 0.5g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, 葡萄糖 10g, 琼脂 20g, 水 1000ml, pH 7.0—7.2。

1.2.3 Sm 培养基: 葡萄糖 10 g, 酵母膏 4.0 g, 蛋白胨 4.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 2.0g, K₂HPO₄ 4.0g, 水 1000ml, pH 7.2—7.4。

1.2.4 原生质体稳定液 (P): 见参考文献[8]。

1.2.5 原生质体再生培养基 (R₂YE): 见参考文献[9]。

1.2.6 发酵培养基: 玉米粉, 黄豆饼粉等。

1.3 原生质体制备、再生和融合

参考 Hopwood 等^[10]的方法。用含 1% Gly 的 Sm 液培养后的菌体经溶菌酶和 Achropeptidase (3mg/ml) 酶解成原生质体, R₂YE 培养基上再生。

$$\text{再生频率(\%)} = \frac{\text{P 溶液稀释后再生菌落数/ml} - \text{SDS 溶液处理的再生菌落数/ml}}{\text{镜检计数的原生质体数/ml}} \times 100$$

采用单亲灭活 (55°C, 30min) 方法进行原生质体融合, PEG1000 (25%) 促融, 间接选择法检出原养型重组子。

$$\text{重组频率(\%)} = \frac{\text{MM 上长出的菌落数}}{\text{CM 上长出的菌落数}} \times 100$$

1.4 高效稳定重组子的筛选

将重组子的孢子制成孢悬液, 涂布于 CM 平板上, 待长出单菌落后打块。继续培养 4—5d, 长出孢子后以深红酵母为测定菌于 PDA 培养基上测定抗菌活性, 挑选抑菌圈大的重组子摇瓶发酵测定效价。同时进行重组子的传代试验, 传 5 代以上不发生分离的为高效稳定重组子。

1.5 重组子活性组分的鉴定

采用硅胶 GF254 板, 正丁醇:正丙醇:乙醇:25%氨水:水 = 40:40:10:45:15 (体积比)展层^[11], 对菌株 Co-N-31 和 F31-24 样品进行薄层层析, 然后在波长 254nm 下观察, 以武夷菌素粗品为对照, 测定样品的 R_f 值。

1.6 温室药效试验

将温室中长出两片叶子的麦苗接种小麦白粉病菌, 接种后第 3 d 喷药, 第 11 d 调查^[12],

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{级数})}{\text{调查总株数} \times \text{发病最重的级数}} \times 100$$

$$\text{防效}(\%) = \frac{\text{对照病指} - \text{处理病指}}{\text{对照病指}} \times 100$$

2 结果

2.1 原生质体形成和再生

甘氨酸浓度、溶菌酶浓度、溶菌时间和时间均影响原生质体的形成。

甘氨酸能阻碍链霉菌细胞壁的合成, 提高菌丝对溶菌酶的敏感性, 加快脱壁^[3], 但高浓度的甘氨酸抑制菌丝生长。因此需要找出对菌丝生长及原生质体释放均有利的甘氨酸浓度。实验结果表明, 菌株 M35 和 M46 的菌丝量随甘氨酸浓度的增加而下降, 原生质体的释放速度随甘氨酸浓度的增加而迅速增加, 其最适浓度为 1.0%。

采用溶菌酶和消色肽酶处理两亲株制备原生质体, 溶菌酶的浓度和原生质体释放量成正比。从图1可以看出, 经最适甘氨酸浓度培养的 M35 和 M46 菌丝其溶菌酶的用量范围 2.0—5.0mg/ml, 分别以 4.0mg/ml 和 5.0mg/ml 为最适, 原生质体释放量均达 10^9 — 10^9 个/ml 以上。

原生质体释放量与溶菌时间及温度有关, 当酶浓度为最适时比较不同温度和时间条件下的原生质体释放量, 结果发现, 菌株 M35 在 28—37℃ 范围内均能释放原生质体, 以 32℃ 时释放量最高。在此温度下, 菌株 M35 和 M46 的原生质体释放高峰分别为 45min 和 60min (图 2)。

原生质体制成后涂 R₂YE 平皿再生, M35 和 M46 的再生频率分别为 3.72% 和 0.240%。

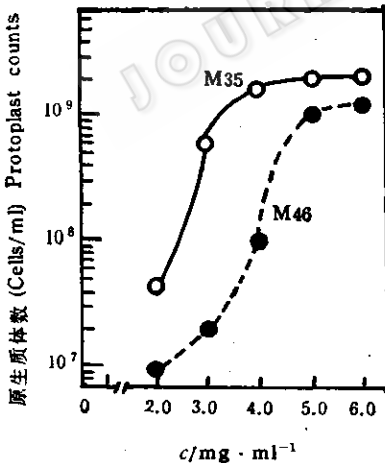


图 1 溶菌酶浓度对原生质体形成的影响

Fig. 1 Effect of lysozyme concentration on protoplast formation

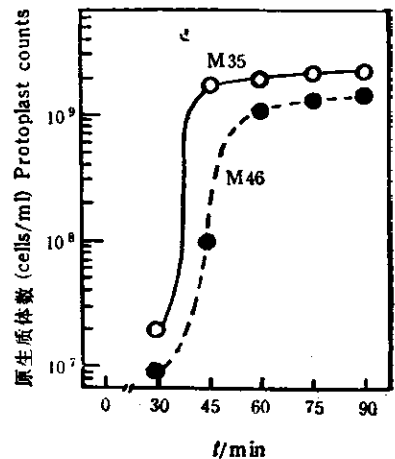


图 2 溶菌时间对原生质体形成的影响

Fig. 2 Effect of time treated with lysozyme on protoplast formation

2.2 原生质体融合及高效稳定重组子的筛选

采用对菌株 M35 单亲灭活 (55℃, 30min), PEG1000 (25%) 促融的方法进行原生质体融合, 菌株 M35 和 M46 的重组频率为 55.2%, 得到的重组子遗传标记稳定, 而菌

表 1 重组子 F31-24 与其亲株的效价比较

Table 1 The comparison of the production of recombinant F31-24 with its parents

菌号 Strains	效价($\times 10^{-6}$) Production	重组子 F31-24 与其亲株的效价比 Production ratio of F31-24 to its parents
Co-N-31	1780	1.82
M35	1750	1.87
M46	1600	2.03
F31-24	3240	—

表 2 温室中几种药剂对小麦白粉病的防治效果

Table 2 The control effect on wheat powdery mildew of several chemicals in greenhouse

处理 Treatment	稀释倍数 Dilution times	病情指数 Disease index	相对防效(%) Relative control effect
Co-N-31	40	8.0	87.72
F31-24	40	4.10	93.71
粉锈宁 Triadimefon	1000	0.37	99.43
对照 CK	清水 water	100	—

株 M35 和 M46 也具有稳定的遗传标记,回复突变率分别为 4.3×10^{-10} 和 2.48×10^{-11} ,故重组菌落必是两亲株基因组发生交换后形成的原养型重组子,而不是亲株自发回复突变的结果。

从 12000 多株重组子中筛选得到一株高效菌株 F31-24,其菌块对红酵母的抑菌圈比原始菌株 Co-N-31 提高了 5—7mm,经摇瓶发酵证明,其效价比菌株 Co-N-31 提高了 82% (表 1)。经传代实验证明,菌株 F31-24 传 5 代以上不发生分离,效价也不降低,为高效稳定重组子。

2.3 重组子活性组分的鉴定

武夷菌素粗品为黄色吸湿性较强的粉末状物质,易溶于水,微溶于甲醇,难溶于乙醇,不溶于其它有机溶剂。薄层层析结果表明,在波长 254nm 紫外光下,硅胶 GF254 板上武夷菌素粗品、菌株 Co-N-31 及菌株 F31-24 发酵液均有 A(Rf = 0.26), B(Rf = 0.50) 两个暗色斑点,粗品及菌株 Co-N-31 发酵液 A 斑点大, B 斑点小,而 F31-24 发酵液则相反(图 3)。挖取斑点测定其活性证明 A、B 均有生物活性,为两个活性组分。也就是说,重组子 F31-24 和原始亲本 Co-N-31 的活性组分含量有异,Co-N-31 含 A 组分多而 F31-24 含 B 组分多。

2.4 温室药效试验

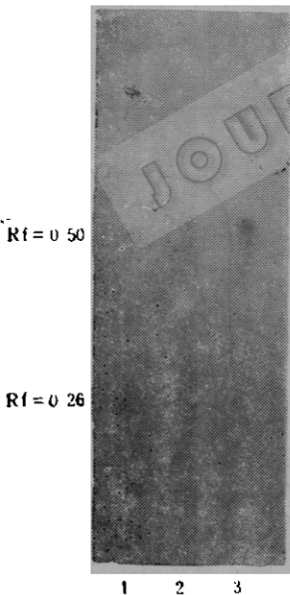


图 3 F31-24 及 Co-N-31 的薄层层析图谱

Fig. 3 TLC pattern of F31-24 and Co-N-31

1. Wuyiencin; 2. Co-N-31;
3. F31-24.

温室中各药剂对小麦白粉病的防治效果如表 2, 重组子 F31-24 的防治效果优于原始亲本 Co-N-31。

3 讨论

从本实验结果来看, 武夷菌素产生菌的两个变株 M35 和 M46 种内原生质体融合由于其基因组同源性强, 所以重组频率高, 融合子遗传稳定, 生命力强; 同时又由于两亲株亲缘关系较近, 融合使控制武夷菌素生物合成的某些基因得到强化或其调控机制得到改变的频率较低, 且两亲株均为营养缺陷型, 其本身的效价就比原始亲本低, 因此重组子代谢产物的单位产量较原始亲本不易有较大幅度的提高。本实验筛选了一万多株重组子, 这些重组子菌块对红酵母的抑菌圈较对照大的只有三百多株, 作者从中选出了稳定重组子 F31-24, 其发酵液效价比菌株 Co-N-31 提高了 82%。

薄层层析结果表明, 武夷菌素粗品含有 A、B 两个组分, A 组分的含量比 B 组分多, 两个组分均有生物活性。菌株 F31-24 和 Co-N-31 的代谢产物均含有 A、B 两个活性组分, 只是 Co-N-31 产物含 A 组分多而 F31-24 产物含 B 组分多, 重组子中基因的交换和重组改变了武夷菌素合成基因的调控机制, 减弱了控制 A 组分合成基因的表达而增强了控制 B 组分合成基因的表达。在防治对象方面, 菌株 Co-N-31 代谢产物可防治蔬菜、果树及粮食作物真菌病害, 如黄瓜白粉病、蕃茄叶霉病、柑桔流胶病等。防治这些病害, 可能是菌株 Co-N-31 产物中一种组分起作用, 也可能是两种组分协同作用。和菌株 Co-N-31 相比, 菌株 F31-24 代谢产物效价的提高和有效组分含量的变化可能使其防治效果有所提高, 防治对象有所增加, 对降低武夷菌素的生产成本、扩大武夷菌素的使用范围等方面均有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 韦日清, 林德忻, 陈志和. 微生物学报, 1984, 24(4): 401—402.
- [2] 黄仲生, 杨玉茹. 生物防治通报, 1985, 1(4): 47.
- [3] Hopwood D A, Wright H M, Bibb M J *et al.* *Nature*, 1977, 268: 171—174.
- [4] Ikeda H, Inoue M, Omura S. *J Antibiot*, 1983, 36: 283—288.
- [5] Omura S, Ikeda H. *J Antibiot*, 1991, 44: 560—563.
- [6] 徐小雪, 张庭兰, 郑幼霞. 生物工程学报, 1985, 1(4): 47—53.
- [7] 袁德军, 周 启. 生物工程学报, 1991, 7: 142—147.
- [8] Okanishi M, Suzuki K, Umezawa H. *J Gen Microbiol*, 1974, 80: 389—400.
- [9] Thompson C J, Ward J M, Hopwood D A. *Nature*. 1980. 286: 525—527.
- [10] Hopwood D A, Wright H M. *J Gen Microbiol*, 1981, 126: 21—27.
- [11] 天津轻工业学院, 大连轻工业学院, 无锡轻工业学院等编著. 工业发酵分析. 北京: 轻工业出版社, 1984, 197—240.
- [12] 方中达. 植病研究方法. 北京: 农业出版社, 1979, 1—13.

ENHANCING THE PRODUCTION OF WUYIENCIN THROUGH PROTOPLAST FUSION

Zeng Hongmei Zhang Zhenlin Shi Yiping Lin Dexin

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

Abstract Two mutants, M35(Leu⁻, grey spore) and M46 (Ser⁻, greyish white spore), were obtained from the producing strain of wuyiencin, strain Co-N-31 (*Streptomyces hygroscopicus* var. *wuyiensis*) and intraspecific protoplast fusion was performed between these two mutants with 25% PEG 1000. The regeneration ratio of the protoplasts was 3.72% for strain M35 and 0.248% for strain M46. Stable prototrophic recombinants with frequency of 55.20% resulted from complementation of nutrient markers of parents were selected indirectly and a highly productive strain F31-24 was obtained from them. The production of F31-24 was 82% higher than that of Co-N-31. The results of TLC indicated that both F31-24 and Co-N-31 had spots at Rf = 0.50 and Rf = 0.26 with different contents. All spots had biological activities. The experiments in greenhouse showed that the control effect of F31-24 on wheat powdery mildew was higher than that of Co-N-31.

Key words Wuyiencin, Production, Protoplast fusion