

# 链霉菌原生质体种间融合重组的研究

## I. 庆丰链霉菌和吸水链霉菌井冈变种的种间融合

郑幼霞 徐小雪 张庭兰

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

本文报道庆丰链霉菌 AS201[His<sup>-</sup>], MS30[Pro<sup>-</sup>Ade<sup>-</sup>Sm<sup>r</sup>] 菌株和吸水链霉菌井冈变种 VA4[His<sup>-</sup>]菌株原生质体的种间融合重组。AS201×VA4融合产生由二亲株营养标记互补的稳定的原养型重组子, 频率为 $1.09 \times 10^{-5}$ — $2.98 \times 10^{-6}$ , MS30×VA4融合产物除原养型重组子, 重组频率为 $5.7 \times 10^{-7}$ 外, 还出现异核体及异质无性系(频率为 $2.8 \times 10^{-4}$ — $2.14 \times 10^{-5}$ )。

得到的原养型重组子, 在孢子颜色、抗药性状、产物性质等方面显现广泛多样的变异。从中得到一个原养型重组菌株RVA18, 它所产生的抗菌物质, 理化和生物性质与亲株产生的庆丰霉素和井冈霉素明显不同。

**关键词** 原生质体融合; 种间重组; 基因交换

长期以来育种工作者从自然界分离、筛选产生新抗生素的菌株, 并通过诱变手段培育抗生素的高产变种, 收到了极为显著的实际成效。随着细菌遗传学研究的深入, 人们期望通过细胞杂交实现基因重组来培育新种, 特别是种间的基因重组被认为具有更大的希望。

在链霉菌方面自从1955年Sermoniti和Spada-Sermoniti用天蓝色链霉菌等进行杂交实验取得成功以后<sup>[1]</sup>, 其它产生抗生素链霉菌的种内杂交重组都相继获得成功<sup>[2-5]</sup>, 链霉菌的种间杂交也先后有了一些报道<sup>[6-9]</sup>。但是一方面由于对链霉菌遗传体系的了解还不够深入, 实验方法的描述也嫌过于简单, 另一方面, 尽管这些种内和种间重组的发生似乎都表现为极性(由于性因子的作用), 但它们的重组频率仍然很低, 单倍体重组子不易获得, 表型改变比较简单, 因之长时期来在实际应用上尚不能作出肯定的评价。

1977年Hopwood等报道了由聚乙二醇(PEG)诱导原生质体融合, 获得高频重组以来<sup>[10]</sup>, 不但多种其它链霉菌种内的高频重组已不难实现<sup>[11-14]</sup>, 而且也有了成功地实现种间融合的实验报道<sup>[15-17]</sup>。我们的工作是以庆丰链霉菌和吸水链霉菌井冈变种作为二亲株进行原生质体融合, 在最低合成培养基上选择营养标记互补的原养型重组子, 并对这些重组子的一些非选择性遗传标记包括孢子颜色, 抗药性状、抗菌活性、代谢产物性质的改变, 进行观察和分析, 结果表明:二个不同种链霉菌通过原生质体融合能够产生多种具有新表型的变种, 从中得到了一株原养型重组子RVA18, 它能在胞内积累一种具有抗菌活

本文于1985年1月3日收到。

缩写符号表示: Ilv<sup>-</sup>为异亮氨酸和缬氨酸缺陷型, Pro<sup>-</sup>脯氨酸缺陷型, Ade<sup>-</sup>腺嘌呤缺陷型, His<sup>-</sup>组氨酸缺陷型, Qm<sup>r</sup> 抗庆丰霉素, Qm<sup>s</sup> 对庆丰霉素敏感, Sm<sup>r</sup> 抗链霉素, Sm<sup>s</sup> 对链霉素敏感。8 MOP-NUV, 近紫外(3650 Å)激活的黄原霉诱变。

性的物质,性质完全不同于二亲株所产生的抗生素(庆丰霉素和井冈霉素)。本文报道实验的部分结果。

## 材料和方法

### (一) 菌株

1. 庆丰链霉菌 AS201 (IIV<sup>-</sup>Qm<sup>+</sup>Sm<sup>+</sup>) 从原养型的 M15 菌株经 NTG 诱变获得。
2. 庆丰链霉菌 MS30 (Pro<sup>-</sup>Ade<sup>-</sup>Qm<sup>+</sup>Sm<sup>+</sup>) 从原养型的 M15 菌株经 NTG 和 8MOPNUV 二次诱变获得。
3. 吸水链霉菌井冈变种 VA 4 (His<sup>-</sup>Qm<sup>+</sup>) 从原养型 75 号菌株经 NTG 诱变获得。
4. 指示细菌: 枯草杆菌 AS1,140。

### (二) 培养基

本文所用各种培养基参照以下文献。庆丰链霉菌固体完全培养基,有机液体培养基,最低合成培养基见参考文献[18]。吸水链霉菌井冈变种的斜面培养基见参考文献[19]。原生质体稳定液 P<sup>[20]</sup>,原生质体再生培养基 R<sub>2</sub>YE<sup>[21]</sup>均按文献方法。

### (三) 原生质体的制备和再生

方法参照前文报道<sup>[14]</sup>。

### (四) 融合重组

方法基本同前<sup>[14]</sup>,吸取配对亲株原生质体各 0.5ml (含能再生菌落的原生质体数不少于 10<sup>7</sup>),合并后离心倾去上清液,将离心管置多用振荡器上(GZ-1,北京冰箱电机厂生产)振动,使沉下的混合原生质体均匀分散于残留的一点P液中,加 1 ml 42% PEG 4000,轻轻摇匀,32℃保温 3—5 min后,加P液 5 ml,离心除去上清,最后均匀悬浮于 1 ml P液中,取 0.1ml 涂布在再生平板上(必要时作适当稀释)。

### (五) 重组子的检出

将融合处理后的原生质体混合液

0.1ml 涂布在 R<sub>2</sub>YE 再生平板上,37℃培养 4—5 天,待孢子成熟后用丝绒影印法复印到最低合成培养基平板上,检出原养型重组子。

### 重组频率的计算:

取融合处理后的原生质体混合液,分别用水和 P 液作适当稀释后,涂布于 R<sub>2</sub>YE 再生培养基平板上,28℃培养后计生长菌落数,用 P 液稀释后再生的菌落数减去用水稀释后生长的菌落数,即为不包含非原生质化单位的真正的原生质体总数。

$$\text{重组频率(\%)} = \frac{\text{重组子数}}{\text{原生质体总数}} \times 100$$

### (六) 异核体(heterokaryon)和异质无性系(heteroclone)的鉴别

当融合混合液在 R<sub>2</sub>YE 再生平板上长成孢子,用丝绒影印到最低合成培养基平板后,长出的菌落中如果有大小差别,大的可能是稳定的原养型重组子,而小的可能是异质无性系或异核体,为了证实,进一步作以下二方面的实验,1.在最低培养基平板上连续复印几代,凡能继续生长的菌落证明为前者(一般为大菌落),凡在传代中发生分离不能继续生长的则属后者(一般为小菌落),2.对分离后的菌落进行营养性状的鉴别,凡分离成二亲株营养缺陷类型的为异核体,除了二亲株型之外还包含有不同的重组类型的则为异质无性系。

## 实验结果

### (一) 庆丰链霉菌 AS201 菌株及吸水链霉菌井冈变种 VA4 菌株的原生质体种间融合

作为亲株的庆丰链霉菌 AS201 (IIV<sup>-</sup>) 及吸水链霉菌井冈变种 (His<sup>-</sup>) 的生理形态特征,在以前的报道中曾作过详细的描述<sup>[22]</sup>,考虑到以下几点性质有利于我们

研究: 1. 具有不同的缺陷标记, 便于选择营养基因互辅的原养型重组子。2. 它们所产生的抗生素, 化学上分属完全不同的两大类(庆丰霉素属核苷类, 井冈霉素属氨基糖类), 对重组子由于基因变异而引起的产物性质的改变比较容易鉴别。3. 菌落大小、孢子颜色差异较大, 对于具有形态改变(包括孢子呈中间色泽)的重组子, 可以一看就能识别。因此我们仍采用这一对菌株作为种间融合的亲本。AS201和VA4原生质体种间融合后, 得到原养型重组子的频率为 $1.09 \times 10^{-5}$ — $2.98 \times 10^{-6}$ (表1), 由此产生的所有重组子遗传性状稳定, 传代中没有观察到营养性状的分离现象, 虽然重组频率和种内融合相比, 低了一些, 但这些菌落却无疑是二亲株基因组发生交换后形成的原养型单倍体重组子, 而不是亲株回复突变的结果, 因为VA4及AS201菌株营养标记的自发回复频率分别为 $2 \times 10^{-9}$ 及 $8.9 \times 10^{-8}$ 。

表 1 AS201 [Iiv<sup>-</sup>] × VA4 [His<sup>-</sup>] 的种间融合重组  
Table 1 Interspecific fused recombination of AS201 × VA4

亲株原生质体总数/ml Total No. of parent protoplast	原养型重组子数/ml No. of prototrophic recombinants	重组频率 Recombination frequency
$1.17 \times 10^8$	$1.28 \times 10^3$	$1.09 \times 10^{-5}$
$1.16 \times 10^8$	$3.46 \times 10^2$	$2.98 \times 10^{-6}$
自发回复频率 Spontaneous reversion frequency VA4, $2 \times 10^{-9}$ ; AS201, $8.9 \times 10^{-8}$		

## (二) 庆丰链霉菌 MS30 菌株和吸水链霉菌井冈变种VA4 菌株的原生质体种间融合

这一对营养缺陷变种原生质体融合的结果, 在最低培养基平板上, 除出现一部分生长正常的较大菌落外, 还有为数不少, 形态不规则的小菌落。将这些菌落同

时复印到最低培养基平板上, 大菌落可以连续传代, 生长正常, 证明为稳定的原养型, 其出现的频率为 $5.7 \times 10^{-7}$ , 而小菌落在经过1—2次复印后, 则逐渐消失, 其出现的频率一般在 $10^{-4}$ — $10^{-5}$ (表2), 把小菌落转移到CM平板上, 使分散生长成单菌落, 再作进一步表型鉴别, 证明小菌落中包括二种类型, 一种是可以分离成为二亲株营养缺陷类型的异核子, 另一种除分离成二亲株外, 还包含少量在单一营养位点上发生交换的重组子(如Pro<sup>-</sup>Ade<sup>+</sup>或Pro<sup>+</sup>Ade<sup>-</sup>)因此是一种异质无性系, 如果把这种异质无性系移植到CM斜面上生长后, 又可以在孢子群中检出原养型菌落(即Pro<sup>+</sup>Ade<sup>+</sup>), 这一点可能表明, 在这一对细胞原生质体融合时, 基因组的不同部位间形成暂时的部分合子(merozygote), 而在DNA复制过程中完成不同基因的交流, 经过产生单标记重组子的阶段, 而最后形成二个标记重组的原养型重组子。

表 2 MS30 [Pro<sup>-</sup>Ade<sup>-</sup>Sm<sup>r</sup>] × VA4 [His<sup>-</sup>] 的种间融合重组

Table 2 Interspecific fused recombination of MS30 × VA4

亲株原生质体总数/ml Total No. of parent protoplast	重组子数/ml No. of recombinant	频率 Frequency	异核体数/ml No. of heterocaryon	频率 Frequency
$3.5 \times 10^7$	$2 \times 10$	$5 \times 10^{-7}$		
$2.07 \times 10^8$			$4.4 \times 10^3$	$2.1 \times 10^{-5}$
$3.5 \times 10^7$			$9.8 \times 10^3$	$2.8 \times 10^{-4}$

## (三) 配对亲株之间的拮抗现象

当庆丰链霉菌和井冈链霉菌原生质体融合混合物涂布在R<sub>2</sub>YE平板上再生时, 孢子成熟后平板上常常呈现类似秃斑的不均匀生长, 如果将平板上的混合孢子洗下, 混匀使在完全培养基平板上分散生长成

单菌落, 任意挑选一定数量, 进行营养需要的测定, 检测二亲株菌落数的比例, 发现庆丰链霉菌菌落数远多于吸水链霉菌井冈变种的菌落数, 其差数甚至可达数十倍。从表3可见, 二亲株原生质体单独涂皿的再生菌落中VA4和AS201之比为26.8, 经过融合处理的再生菌落中, VA4和AS201的比例只有0.017—0.055, 二者相比, 表明产生庆丰霉素的MS30菌株对VA4菌株的生长产生了明显的拮抗作用。(井冈霉素对MS30没有拮抗作用)。

表3 MS30×VA4融合中二亲株之间的拮抗作用  
Table 3 Antagonism between two parents in MS30 x VA4 fusion

二亲株分别再生菌落数/ml Colony no. of parents grown separately		比例 Ratio	二亲株融合再生菌落数/ml Colony no. of parents grown mixedly				比例 Ratio
		VA4 MS30	No. of colonies examined		VA4 MS30		VA4 MS30
VA4	MS30						
6.7×10 <sup>7</sup>	2.5×10 <sup>6</sup>	26.8	234	4	230	0.017	
			152	7	145	0.048	
			115	9	109	0.055	

(四) 重组子的非选择性表型分析

对由VA4×AS201种间融合所产生的原养型重组子的一些非选择性遗传特性与二亲株作了对比和分析, 从表4表5所列的结果可以看到在孢子颜色、抗药标记, 抗菌产物特性等方面, 除了分别包含亲株型外, 还出现各种不同的新类型, 可能表

明这是二个不同种链霉菌的基因组在融合交换过程中发生了新的基因组合的结果。

表4 重组子和亲株孢子颜色及抗药性的比较  
Table 4 Comparison of spore color and drug resistance between recombinants and parents

菌株 Strain	融合亲株 Fusion parents	重组子 Recombinants
孢子颜色 Spore color	VA4 灰绿 (gray green)  AS201 灰白 (gray white)	亲株型 (parent type) RVA19 灰绿 (gray green) RVA3 灰白 (gray white) 重组型 (recombination type) RVA17 灰褐 (Gray brown) RVA16 粉红 (pink) RVA4 乳白 (milky white) RVA20 青灰 (bluish white) RVA18 浅灰 (grayish)
抗药性 Drug resistance	VA4 Qm <sup>r</sup> Sm <sup>s</sup>  AS201 Qm <sup>r</sup> Sm <sup>s</sup>	亲株型 (parent type) RVA16 Qm <sup>r</sup> Sm <sup>s</sup> RVA14 Qm <sup>r</sup> Sm <sup>s</sup> 重组型 (recombination type) RVA4 Qm <sup>r</sup> Sm <sup>s</sup> RVA20 Qm <sup>r</sup> Sm <sup>s</sup>

表5 重组子和亲株产物的特性比较  
Table 5 Comparison of product characters between recombinants and parents

菌株 Strain	融合亲株 Fusion parents		重组子 Recombinants		
	VA4	AS201			
产物 Product	井冈霉素 Jinggangmycin	庆丰霉素 Qingfengmycin	RVA3	RVA8	RVA18

存在部位 location	胞 外 Extra-cellular	胞 外 Extra-cellular	胞 外 Extra-cellular	胞 外 Extra-cellular	胞 内 Intra-cellular
酸 碱 性 Acid-basic property	碱 性 Basic	碱 性 Basic	碱 性 Basic	碱 性 Basic	酸 性 Acidic
溶 解 性 Soluble property	水 溶 Water soluble-	水 溶 Water soluble	水 溶 Water soluble	水 溶 Water soluble	水不溶 Water insoluble
紫 外 UVnm	末端吸收 End absorption	274	274	末端吸收 End absorption	末端吸收 End absorption
抗 菌 活 性 antimicro- bial acti- vity	真 菌 Fungi	真菌、细菌 Fungi, bacteria	真菌、细菌 Fungi, bacteria	真菌、细菌 Fungi, bacteria	真菌、细菌 Fungi, bacteria
苯酚-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 反应 phenol- H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> reaction	+	-	-	-	+

## 讨 论

从本文所列的实验结果以及文献报道的资料来看<sup>[15-17]</sup>, 都同样反映出链霉菌种间融合重组频率不太高, 这里报道的二标记重组频率为 $10^{-5}$ — $10^{-8}$ , 三标记重组频率为 $10^{-7}$ 。弗氏链霉菌[Met<sup>-</sup>]和比基尼链霉菌[Nic<sup>-</sup>Ade]融合得到Nic<sup>+</sup>或Ade<sup>+</sup>重组子的频率分别为 $2.5 \times 10^{-8}$ 和 $1.7 \times 10^{-5}$ <sup>[15]</sup>。Hopwood在一篇文章中也曾经提到, 亲缘关系很近的天蓝色链霉菌A3(2)种交链霉菌66的种间融合频率很低且不易重复, 而天蓝色链霉菌和小小链霉菌的种间融合没有得到重组子<sup>[23]</sup>。为什么种间融合频率那么低? Hopwood曾经作过分析, 认为基因组的不完全同源, 不同限制修饰系统的存在, 种间重组引起基因重排, 缺失, 而使重组子失去生活力等都可能发生种间基因交换所存在的障碍。在我们的实验中观察到二亲株原生质体融合混合物在R<sub>2</sub>YE平板上再生时出现的明显

拮抗现象(表3), 推测这是一种庆丰链霉菌产生的庆丰霉素对吸水链霉菌井冈变种的抑制作用, 这种一方产物抑制另一方, 或双方产物相互抑制对方的作用, 很可能也是影响种间基因重组的重要原因之一, 如果选择二株相互不发生拮抗的链霉菌作为种间融合的亲株, 也许有可能改善由此引起的问题, 我们认为, 进一步探明存在于链霉菌种间融合时阻碍基因交换的原因, 并加以克服, 那末就有可能提高种间融合的重组频率, 从而得到更多的重组子。

## 参 考 文 献

- [1] Sermonti, G. and I. Spada-Sermonti: *Nature*, 176:121, 1955.
- [2] Alikhanian, W. and Z. Minclin: *Nature*, 180:1208, 1957.
- [3] Szybalski, W. and D. H. Braeudle: *Bact. proc.*, 48:1965.
- [4] 李焕姿: 抗生素研究(Ⅱ) 抗生素的生产工艺, 董村、张为中主编, 上海出版社, 83页, 1961年.
- [5] 刘颀屏、经降仙: 同上69页, 1961年.
- [6] Alacevic, M.: *Nature*, 197: 1323, 1963.
- [7] Polsinelli, M. and M. Beretta: *J. Bact.*, 91: 61, 1966.
- [8] Lamovskya, N. D. et al.: *J. Gen. Microbi-*

- ol., 98: 187, 1977.
- [9] 刘顾屏等: 微生物学报, 10(2):195, 1964.
- [10] Hopwood, D.A. et al.: *Nature*, 268:171 1977.
- [11] Baltz, R.H.: *J. Gen. Microbiol.*, 107:93, 1977.
- [12] Ochi, K. et al.: *J. Bact.*, 139: 984, 1979.
- [13] Ogawa, H. et al.: *J. Antibiotics*, 38(2): 184, 1983.
- [14] 王洪洲, 郑幼霞: 遗传学报, 9(3):172, 1982.
- [15] Godfrey, O.: *Can. J. Microbiol.*, 24(8): 994, 1978.
- [16] Yamashita, F. et al.: In Abst. 4th Genetics of Industrial Microorganisms, Kyoto, June 6-11, 1982, p108.
- [17] 八本泽守正, 堀田国元: 化学の領域, 37(6): 392, 1983.
- [18] 郑幼霞等: 遗传学报, 7(2):111, 1980.
- [19] 上海农药研究所农用抗菌素组: 微生物学报, 15(2):110, 1975.
- [20] Okanishi, M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 80: 389, 1974.
- [21] Thompson, C.I. et al.: *Nature*, 268: 525, 1980.
- [22] 郑幼霞等: 遗传学报, 9(6):423, 1982.
- [23] Hopwood, D.A.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 35: 237, 1981.

## STUDIES ON INTERSPECIFIC RECOMBINATION OF *STREPTOMYCES* THROUGH PROTOPLAST FUSION

### I. INTERSPECIFIC FUSION BETWEEN *S. QINGFENGMYCETICUS* AND *S. HYGROSCOPICUS* VAR. *JINGGANGENSIS*

Zheng Youxia Xu Xiaoxua Zhang Tinglan

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica)

This paper reports the results of interspecific recombination through protoplast fusion between *S. qingfengmyceticus* strain AS201 ( $IIV^-$ ), MS30 ( $Pro^- Ade^- Sm^r$ ) and *S. hygroscopicus*, var. *jinggagensis* strain VA4 ( $His^-$ ). Fusion of AS201 × VA 4 produces stable prototrophic recombinants with frequency of  $1.09 \times 10^{-5}$ — $2.98 \times 10^{-6}$  resulted from complementation of parents nutrient markers. Fusion products of MS30 × VA 4 are composed of prototrophic recombinants, heterocaryons and heteroclones, and the frequency is about  $5.7 \times 10^{-7}$  for prototrophic recombinants and  $2.8 \times 10^{-4}$ — $2.14 \times 10^{-5}$  for heterocaryons plus heteroclones.

All of the prototrophic recombinants display a great variety in spore color, drug resistance and their metabolites properties. One of them, strain RVA18, produces a new metabolite with quite different physico-chemical and biological characters from qingfengmycin and jinggangmycin, two antibiotics produced by its parents.

#### Key words

Protoplast fusion; interspecific recombination; gene exchange