

瑞拉菌素产生菌 RL-2 的诱变育种

苟丽霞 安德荣* 刘双发 李 晶

(西北农林科技大学植物保护学院 陕西省农业分子生物学重点实验室 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 本研究以委内瑞拉链霉菌秦岭变种 RL-2(*Streptomyces venezuelae* var. *qinlingensis* RL-2)为出发菌株, 分别采用紫外线、氯化锂及紫外线加氯化锂的复合诱变方式对其孢子悬液进行诱变处理。在复合诱变的紫外线照射时间为 45 s 和氯化锂浓度为 0.4% 的情况下, 获得一株瑞拉菌素的高产突变菌株 UVL-108 且连续传接 6 代其遗传特性较稳定。采用双向培养及生长速率法对其进行初筛和复筛, 结果表明: UVL-108 的拮抗性能较出发菌株提高了 77%, 其发酵液对稻瘟病菌的抑菌毒力是出发菌株的 3 倍。

关键词: 链霉菌, 诱变, 瑞拉菌素, 拮抗性能

Mutational Screening of Zuelacmycin-producing Strain RL-2

GOU Li-Xia AN De-Rong* LIU Shuang-Fa LI Jing

(College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this research, the zuelacmycin-producing strain *Streptomyces venezuelae* var. *qinlingensis* RL-2 was used as original strain, the spore suspension of which was induced by UV, LiCl and the compound treatment (UV+LiCl) respectively. The zuelacmycin-high-yield strain UVL-108 was obtained by the treatment that the exposure time under UV irradiation was 45 s and the concentration of LiCl was 0.4%. The heredity characters of mutant UVL-108 were stable in successive six generations. The antibacterial activity and the fermentation titer of mutant UVL-108 were determined by bidirectional culture and mycelial linear growth respectively. The results demonstrated the antibacterial activity of mutant UVL-108 was improved by 77%, and the relative toxicity of fermentation to *Phyricularia grisea* was improved by two times compared with the original strain.

Keywords: *Streptomyces*, Mutagenesis, Zuelacmycin, Antibacterial activity

瑞拉菌素是西北农林科技大学植物病理实验室和西安海浪生物研究所自主开发的一种新型氨基糖苷类农用抗生素。其产生菌 RL-2 菌株是本实验室从 1988 年起通过对秦岭山区原始森林土壤中放线菌资源进行研究, 从中筛选分离的对植物真菌病害有明显抑制作用的一株放线菌, 该菌株是委内瑞拉链霉

菌的新变种。经过二十多年的研究, 已在瑞拉菌素的生物活性、理化性质、菌株鉴定、抑菌谱、发酵工艺、分离纯化、分子结构等方面取得很大进展。实验证明瑞拉菌素对稻瘟病菌、小麦赤霉病菌、黄瓜枯萎病菌和番茄枯萎病菌等有强拮抗作用^[1-3]。但 RL-2 野生型菌株产素能力很低, 不能直接作为生产

菌种, 从而限制了对它的进一步研究和利用。从工业生产的角度来说, 选育效价高、稳定性好的优良菌株是抗生素筛选过程中的基础工作之一, 而菌种的改良工作是提高产量和生物活性、降低成本的主要途径^[4,5]。本研究对 RL-2 菌株进行了紫外线、氯化锂及紫外线加氯化锂的复合诱变改良, 以期获得拮抗性能更好的高产菌株, 为其下一步的中试生产提供理论依据和实践经验。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种: 出发菌株委内瑞拉链霉菌新变种 RL-2(*Streptomyces venezuelae* var. *qinlingensis* RL-2) 和指示菌株稻瘟病菌(*Phyricularia grisea*)均由西北农林科技大学植物病理实验室前期实验分离、保存。

1.1.2 培养基: 1) 斜面 and 固体培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 18 g, 碳酸钙 0.2 g, 硫酸镁 0.2 g, 蒸馏水定容至 1 L, 自然 pH 值, 1.0×10^5 Pa 灭菌 15 min; 2) 发酵培养基: 黄豆饼粉 20 g, 葡萄糖 10 g, 淀粉 15 g, 磷酸氢二钾 0.5 g, 碳酸钙 2.5 g, 蒸馏水定容至 1 L, pH 8.0, 高压灭菌。

1.2 诱变剂 量及方法

1.2.1 孢子悬液的制备: 将培养 7 d 的斜面菌株, 用无菌生理盐水制成孢子悬液, 放入摇床 200 r/min, 28°C 培养 2 h, 然后用无菌脱脂棉过滤除去菌丝体, 用无菌水将孢子悬液稀释到 10^8 个/mL, 即制成诱变用的 RL-2 菌株孢子悬液。

1.2.2 紫外线诱变: 操作在红光下进行, 取孢子悬液 6 mL 置于直径 9 cm 的带搅拌子平皿中, 距 15 W 紫外灯 30 cm 处, 照射时间分别为 15 s、30 s、45 s、60 s、75 s 和 90 s。将诱变后的孢子悬液在红光下系列梯度稀释至浓度为 1.0×10^{-5} 和 1.0×10^{-6} 后涂平板(每个时间段、每个浓度涂 3 个平板)。以未经照射的菌悬液涂平板作对照, 28°C 避光培养 7 d, 计算致死率^[6]。

1.2.3 氯化锂诱变: 用无菌水将孢子悬液系列梯度稀释至 1.0×10^{-5} 和 1.0×10^{-6} , 各取 0.1 mL 涂布于含有氯化锂的平板, 其中氯化锂的浓度梯度设为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 和 0.6%, 每种处理做 3 个重复, 以未处理的菌悬液涂平板作对照, 于 28°C 避光培养 7 d, 计算致死率。

1.2.4 紫外线和氯化锂的复合诱变: 根据紫外线和

氯化锂对孢子液的处理结果, 确定复合诱变中紫外线和氯化锂的诱变剂量, 将紫外线照射后的孢子悬液稀释后涂于含氯化锂的平板, 28°C 避光培养 7 d。

1.3 高效菌株的筛选

1.3.1 突变菌株的初筛: 每种处理挑取长势良好、菌落形态各异的单菌落进行初筛, 采用双向培养法^[6]。将不同处理后抑菌效果好的菌株进行复筛。

1.3.2 摇瓶发酵复筛: 将初筛所得的各高效正突变菌株以单菌落接种于装有 10 mL 发酵培养基的 50 mL 三角瓶中, 以 RL-2 出发菌株为对照, 置于 28°C、150 r/min 条件下发酵 72 h, 对发酵液进行预处理^[7]。采用生长速率法测定其发酵产物对稻瘟病菌的抑菌效果^[8]。

1.4 遗传稳定性实验

挑取经筛选的对稻瘟病菌有较强抑制效果的突变菌株进行传代培养, 连续传 6 代, 对每一代进行摇瓶发酵培养, 并对发酵原液进行预处理, 采用牛津杯法^[9]测定其抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 不同处理诱变剂量的确定

2.1.1 紫外线诱变剂量的确定: 紫外线对 RL-2 菌株的诱变效应如图 1 所示。随着紫外线对孢子处理时间的延长, 致死率增大, 在照射时间为 75 s 时, 致死率达到 95% 以上, 正突变率先上升但随后下降, 在紫外线处理时间为 45 s 时的致死率为 88.5%, 正突变率为 12.5%, 为所处理组中最高。因此将紫外线处理时间确定为 45 s。

2.1.2 氯化锂诱变剂量的确定: 氯化锂对 RL-2 菌株的诱变效应如图 2 所示。随着氯化锂处理浓度的

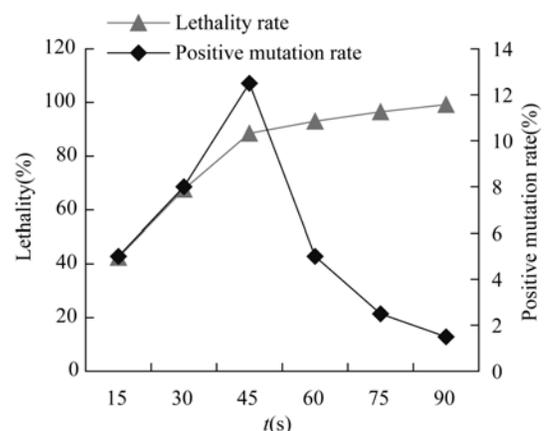


图 1 紫外线的诱变效果

Fig. 1 Impact of UV mutation

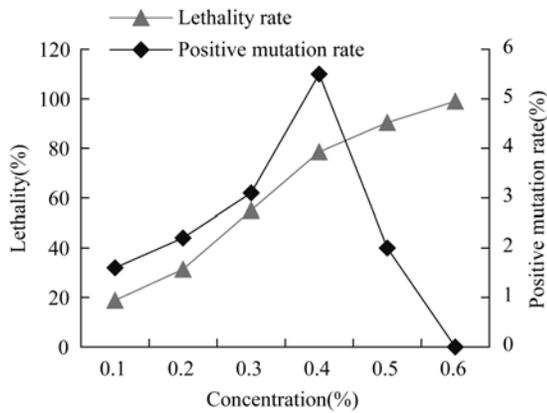


图2 LiCl 的诱变效应

Fig. 2 Impact of LiCl mutation

增高致死率增大, 在氯化锂处理浓度为 0.6% 时, 培养基平板上几乎无菌落生长。正突变率先上升但随后下降, 在氯化锂浓度为 0.4% 时, 致死率为 78.5%, 正突变率为 5.5%, 因此将氯化锂处理浓度确定为 0.4%。

2.1.3 紫外线和氯化锂复合诱变剂量的确定: 根据上述 2.1.1 及 2.1.2 的实验结果, 在复合诱变中将紫外线的照射时间确定为 45 s, 氯化锂浓度为 0.4%。

2.2 不同处理正突变菌株的初筛结果

三种不同诱变法对 RL-2 菌株处理后, 共挑出 354 株突变菌株。其初筛结果见表 1。由表 1 可知, 在

45 s 紫外线诱变处理后筛选出 4 株抑菌活性较高的突变株 UV-38、UV-76、UV-81 和 UV-103, 其中 UV-81 和 UV-103 对稻瘟菌的抑菌效果比出发菌株分别增加了 53% 和 54%; 在 0.4% 氯化锂诱变处理后共筛选出 2 株抑菌活性较高的突变株 L-35 和 L-69, 其对稻瘟菌的抑菌效果同出发菌株相比, 分别增加了 25% 和 30%; 在 45 s 紫外线和 0.4% 氯化锂对菌株进行复合诱变后共筛选出 5 株抑菌活性较高的突变株 UVL-27、UVL-76、UVL-83、UVL-108 和 UVL-127, 其中 UVL-108 的抑菌效果较出发菌株提高了 77%, UVL-83 和 UVL-127 的抑菌效果和出发菌株相比均提高了 58%。说明紫外线和氯化锂对菌株的复合诱变效果要好于单一紫外线或氯化锂的诱变效果。

2.3 高产菌株的复筛

将初筛所得的 11 株高产菌株进行摇瓶发酵复筛, 采用抑制菌丝生长速率法测定各初筛菌株的发酵液对稻瘟病菌的抑菌活性(表 2)。由表 2 可知, 复合诱变所得高产菌株对稻瘟病菌抑菌效果优于单一紫外线或氯化锂的诱变效果, 复合诱变所得 5 株突变菌株的发酵液对稻瘟病菌的毒力和出发菌株均达到 2 倍以上, 其中 UVL-108 的毒力是出发菌株的 3 倍。而单一氯化锂诱变所得两株高产突变菌株是所筛选突变株中毒力最低的。

表 1 不同处理的突变菌株的初筛结果
Table 1 Screening results of mutants with different treatments

菌株 Strain	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibition zone					平均值* Average value	相对效价 Relative potency(%)	
	1	2	3	4	5			
CK(RL-2)	16.5	16.3	16.5	16.9	16.8	16.60 ± 0.189	H	100
UV-38	22.3	22.0	21.8	22.0	22.5	22.12 ± 0.191	F	133
UV-76	23.6	23.4	24.2	24.0	23.2	23.68 ± 0.279	E	143
UV-81	25.8	25.2	25.7	25.1	25.2	25.40 ± 0.213	D	153
UV-103	25.7	25.0	26.4	25.6	25.5	25.64 ± 0.323	CD	154
L-35	20.3	20.8	21.1	21.0	20.8	20.80 ± 0.218	G	125
L-69	21.5	21.2	21.1	22.2	21.8	21.56 ± 0.314	F	130
UVL-27	25.1	24.7	25.0	25.1	25.3	25.04 ± 0.145	D	151
UVL-76	26.2	25.8	25.8	26.3	26.2	26.06 ± 0.157	BC	157
UVL-83	26.3	25.8	26.7	26.4	26.0	26.24 ± 0.228	BC	158
UVL-108	29.7	29.2	29.8	28.8	29.5	29.40 ± 0.256	A	177
UVL-127	26.6	25.7	26.2	26.5	26.5	26.30 ± 0.240	B	158

注: *经 DPS 统计学软件 Duncan 多重比较, 显著水平 $P=0.0001$ 。

Note: By the Duncan multiple comparison of DPS, the significant level $P=0.0001$.

表 2 高产菌株的复筛结果
Table 2 Results of high-production strains re-screened from mutants

菌株 Strain	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 R	EC ₅₀ (mL/L)	相对毒力 Relative toxicity
CK(RL-2)	$y=1.4328+1.9673x$	0.9987	65.0579	1.00
UV-38	$y=1.3954+2.2447x$	0.9963	40.3483	1.61
UV-76	$y=1.2122+2.4328x$	0.9878	36.0585	1.80
UV-81	$y=1.2994+2.5680x$	0.9922	27.6087	2.36
UV-103	$y=1.4136+2.4897x$	0.9892	27.5749	2.36
L-35	$y=1.2263+2.3453x$	0.9808	40.6453	1.60
L-69	$y=1.2830+2.3268x$	0.9887	44.6650	1.46
UVL-27	$y=1.4450+2.4090x$	0.9907	29.9026	2.18
UVL-76	$y=1.3886+2.4733x$	0.9870	28.8492	2.26
UVL-83	$y=1.2191+2.6304x$	0.9924	27.3813	2.38
UVL-108	$y=1.2563+2.8111x$	0.9893	21.4670	3.03
UVL-127	$y=1.2128+2.7768x$	0.9908	23.1152	2.81

表 3 UVL-108 的遗传稳定性测定结果
Table 3 Genetic stability of strain UVL-108

世代 Generations	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibition zone					平均值 Average value	显著水平(5%) Significance level
	1	2	3	4	5		
F1	29.6	29.0	30.2	29.5	29.0	29.46 ± 0.313	a
F2	29.8	29.2	28.8	28.8	29.4	29.20 ± 0.267	a
F3	30.0	30.4	29.5	29.7	29.5	29.82 ± 0.240	a
F4	28.8	29.4	29.2	29.5	29.7	29.32 ± 0.215	a
F5	29.0	29.1	28.8	30.0	30.6	29.50 ± 0.482	a
F6	29.5	29.5	30.0	28.5	29.0	29.30 ± 0.360	a

注: a: 表示 DPS 统计学软件处理后的显著水平。

Note: a: Denotes the significant level by DPS statistical software.

2.4 突变菌株遗传稳定性测定结果

用牛津杯法对高产突变株 UVL-108 进行了遗传稳定性测定实验, 结果见表 3。由表 3 可知, 连续传代 6 次后, 突变株 UVL-108 的发酵液对指示菌的拮抗性能基本稳定, 在 5% 的水平上 F1~F6 代对稻瘟病菌的抑菌圈大小没有显著差异, 说明 UVL-108 的遗传稳定性较好。

3 讨论

从工业生产的角度来说, 选育效价高、稳定性好的优良菌株是抗生素筛选过程的最终目的, 因此建立每个菌种简单而又能反映最终效价高低的筛选方法至关重要^[4]。本研究以野生瑞拉菌素产生菌的孢子悬液为诱变材料, 通过紫外线照射处理、不同浓度氯化锂溶液处理及紫外线和氯化锂复合诱变三

种处理方法对菌株进行选育, 得到稳定高产菌 UVL-108, 这比从大量野生菌种中筛选瑞拉菌素高产菌株具有直接、高效和可选范围大的优势。

紫外线作为一种物理诱变因子, 具有诱变效果明显和方法简便等优点, 广泛应用于工业微生物育种^[10]。氯化锂是无机诱变剂, 做为转录阻滞剂参与蛋白质的合成, 通过顺式作用元件作用于 DNA, 使之形成基因增强子或者启动多拷贝基因, 和紫外线一起对菌株进行复合诱变能增强紫外线的诱变效果^[11]。孙嘉龙等采用紫外线及氯化锂对产 Monacolin K 红曲菌株进行复合诱变, 得到的正突变菌株 Monacolin K 的产量比出发菌株提高 3.3 倍^[12]。本研究利用紫外线和氯化锂对 RL-2 菌株进行复合诱变比单一紫外线或氯化锂诱变效果好。其中复合诱变所得高产菌株 UVL-108 的发酵效价较出发菌株提高

了 2 倍, 经传代实验表明其遗传稳定性较好。最优菌株的筛选往往不能靠一轮的诱变而完成^[13], 得到高产且遗传性能稳定的工业菌种是实现规模化生产的前提, 因此该研究的后续诱变处理会采取多轮诱变处理的方式, 以进一步提高 RL-2 菌株的拮抗性能。

参 考 文 献

- [1] 安德荣, 慕小倩. 瑞拉菌素产生菌的鉴定. 微生物学杂志, 2002, 22(2): 5-6.
- [2] 陈 丽, 疏秀林, 安德荣, 等. 土壤拮抗放线菌 s-5210-6 活性产物抑菌谱及其作用机制. 植物保护学报, 2007, 34(3): 277-282.
- [3] 孙现超, 安德荣, 李爱荣, 等. 土壤拮抗放线菌 s-930-6 菌株活性产物抑菌作用. 植物保护学报, 2005, 32(1): 33-36.
- [4] 文采艺, 白建保, 吴元华. 农用抗生素 TS99 高产菌株的选育. 微生物学通报, 2008, 35(3): 384-388.
- [5] 吴元华, 高 芬, 杜春梅, 等. 嘧肽霉素高产菌株的选育. 中国生物防治, 2008, 24(1): 58-62.
- [6] 卢庭婷, 李 涛, 梁智群. 水稻稻瘟病拮抗链霉菌的诱变选育. 西南农业学报, 2007, 20(4): 577-580.
- [7] 李 晶, 安德荣, 刘翠娟, 等. 放线菌 S-159-05 抑菌活性物质的初步研究. 农药, 2007, 46(11): 755-757.
- [8] 慕立义. 植物化学保护研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1991, pp.79-81.
- [9] 余 卿. 抗菌素的菌株选育. 微生物学杂志, 1987, 7(2): 75-83.
- [10] Meyer SLF, Massoud SI, Chitwood DJ, *et al.* Evaluation of *Trichoderma virens* and *Burkholderia cepacia* for antagonistic activity against Root-knot Nematode, *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, 2000, 2(8): 871-879.
- [11] 祁桂林, 王 群, 张 弘. 复合诱变选育青霉素高产菌株. 河北医药, 2006, 28(4): 335-336.
- [12] 孙嘉龙, 邹 晓, 刘爱英, 等. 高产 Monacolin K 红曲菌株的复合诱变选育. 菌物学报, 2007, 26(4): 507-516.
- [13] Huang XW, Cheng W, Hu YY. Screening of flocculant-producing strains by NTG mutagenesis. *Journal of Environmental Sciences*, 2005, 17(3): 494-498.

编辑部公告

中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中国科学院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 已取得北京市工商局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)及《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各种服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如有刊登广告的需要, 欢迎与我们联系或 email 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提示: 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请汇入以下新账号:

收款单位: 中国科学院微生物研究所

开户银行: 中国工商银行北京分行海淀西区支行

帐 号: 0200004509089117425

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武文 王 闵

电子信箱: gg@im.ac.cn

网 址: <http://journals.im.ac.cn>