

新型物理诱变方法及其在微生物诱变育种中的应用进展

陈义光 (云南省微生物研究所, 教育部微生物资源重点实验室(云南大学), 云南 昆明 650091;)
(吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000)

李铭刚, 徐丽华 (云南省微生物研究所, 教育部微生物资源重点实验室(云南大学),)
(云南 昆明 650091)

刘祝祥 (云南省微生物研究所, 教育部微生物资源重点实验室(云南大学), 云南 昆明 650091;)
(吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000)

夏振远 (云南省烟草科学研究院玉溪农业研究所, 云南 玉溪 653100)

文孟良 (云南省微生物研究所, 教育部微生物资源重点实验室(云南大学), 云南 昆明 650091)

[摘要] 综述了新型物理诱变方法离子注入(Ion Implantation)、激光(Laser)和微波(Microwave)的生物学效应及其近年来在微生物诱变育种中的研究与应用。

[关键词] 微生物诱变育种; 物理诱变方法; 离子注入; 激光; 微波

[中图分类号] Q6-33; Q937

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-1409(2005)05-0046-03

以人工诱发基因突变为基础的诱变育种具有速度快、收效大、方法简单等优点, 它是菌种选育的一个重要途径, 在发酵工业菌种选育上具有卓越的成就, 迄今为止国内外发酵工业中所使用的生产菌种绝大部分是人工诱变选育出来的。近年来, 虽然随着代谢控制理论、基因工程技术、蛋白质点突变技术等生物技术的发展, 代谢控制育种、杂交育种, 特别是基因工程育种在微生物育种工作中发挥着越来越大的作用^[1~3], 但是, 传统的(“经典的”)诱变育种仍是大多数工业微生物育种最重要、最有效的技术^[4~6]。

诱变育种依据其所使用诱变剂类别分为物理诱变、化学诱变和生物诱变。其中物理诱变是使用各种射线对微生物进行诱变操作, 效果较好、应用较广泛的是紫外线(UV)、X 射线和 γ 射线。但是, 随着这些诱变剂的反复使用, 很多工业生产菌株对其产生了耐受性。为此, 许多学者尝试开发应用一些新型物理诱变方法用于微生物诱变育种, 并取得了较好的效果。本文对一些新型物理诱变剂的生物学效应及其近年来在微生物诱变育种中的研究与应用作了综述。

1 离子注入(Ion Implantation)

离子注入是 20 世纪 80 年代初兴起的一项高新技术, 主要用于金属材料表面的改性。1986 年以来逐渐用于农作物育种, 近年来在微生物育种中逐渐引入该技术。

1.1 注入及其生物学效应

离子注入诱变 是利用离子注入设备产生高能离子束(40~60 ke V)并注入生物体引起遗传物质的永久改变, 然后从变异菌株中选育优良菌株的方法。离子束对生物体有能量沉积(即注入的离子与生物体大分子发生一系列碰撞并逐步失去能量, 而生物大分子逐步获得能量进而发生键断裂、原子被击出位、生物大分子留下断键或缺陷的过程)和质量沉积(即注入的离子与生物大分子形成新的分子)双重作用, 从而使生物体产生死亡、自由基间接损伤、染色体重复、易位、倒位或使 DNA 分子断裂、碱基缺失等多种生物学效应。因此, 离子注入诱变可得到较高的突变率, 且突变谱广, 死亡率低, 正突变率高, 性状稳定^[4~7]。

[收稿日期] 2005-03-29

[第一作者简介] 陈义光(1965-), 男, 湖南新化县人, 在读博士生, 吉首大学生物资源与环境科学学院副教授。

1.2 离子注入在微生物育种中的应用

我国 1994 报道了离子注入链霉菌的诱变效应,获得 26.73%的正突变率,1995 年又有报道指出,采用 N⁺、C⁴⁺ 注入核糖霉素产生菌、卡那霉素产生菌时,其中以 N⁺ 诱变效果最显著^[4]。近几年来我国学者在离子注入微生物诱变育种方面陆续做了一些探索^[8~17]。有关工作简介如表 1。

表 1 离子注入法微生物诱变育种研究进展
Table 1 Review of studies on microorganism breeding induced by ion implantation

菌 株	诱变因素	主要目的	突变株特性	时间	文献号
<i>Streptomyces erythreus</i>	40~60 keV N ⁺	红霉素	提高 20%	1997	[8]
<i>Bacillus megaterium</i>	10~20 keV N ⁺	2-酮基-L-古龙酸	提高 18.8%	1998	[9]
<i>Micromonospora purpura</i>	7 MeV/U ¹⁶ O ⁶⁺	庆大霉素	正突变高	1998	[10]
	20.7 MeV/ U ⁴⁰ Ar ¹⁴⁺		效价提高		
<i>Rhodotorula</i> RY Strain	50 MeV/ U ¹² C ⁶⁺	胡萝卜素	获得较多变易株	2001	[11]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 keV N ⁺	麦角醇	提高 60%	2000	[12]
<i>Bacillus subtilis</i>	20 keV N ⁺ 、H ⁺ 、Ar ⁺	抗真菌物质	有所提高	2001	[13]
<i>Aspergillus terreus</i>	10 keV N ⁺	衣康酸	有所提高	2002	[14]
<i>Arthrobacter glopiiformis</i>	30 keV N ⁺	黄嘌呤氧化酶	提高 43%	2002	[15]
<i>Streptomyces spectabilis</i>	10 keV N ⁺	壮观霉素	提高 102.3%	2002	[16]
<i>Penicillium patulum</i>	10 keV N ⁺	灰黄霉素	提高 26.8%	2003	[17]

2 激光(Laser)

激光作用于生物体产生压力、热效应、电磁效应及其综合作用,引起生物大分子的变化,导致遗传变异。激光作为一种育种方法,具有操作简单、使用安全等优点,近年来应用于微生物育种中取得不少进展。胡卫红等^[18]采用 CO₂ 激光辐照酿酒酵母(*Saccharomyces cereisiae*) AS2. 1189,筛选到乙醇产量有较大提高的变异株。通过对变异株乙醇脱氢酶同工酶的比较分析发现,其酶谱与出发菌株有所不同,证实 CO₂ 激光确实有诱变作用。韩建荣等^[19]采用 He-Ne 激光对青霉 PT95(*Penicilium* sp.) 的原生质体进行诱变处理,选育到一株生物量和类胡萝卜素含量均有显著提高的变异菌株 L05,传代试验表明 L05 具有良好的遗传稳定性。周蓬蓬等^[20]应用 YAG 激光照射高山被孢霉(*Mortierella alpina*) 获得了花生四稀酸和油脂含量分别提高 2.45 倍和 1.71 倍的高产菌株。彭益强等^[21]采用 1.06 μm、15 kHz 高重复率声光 QN d: YAG 激光分别对产植酸酶黑曲霉的孢子悬液和原生质体进行处理,发现原生质体比孢子耐受激光诱变的能力强,并且效果好,选育到一株酶活提高 3.75 倍的变异株。

3 微波(Microwave)

微波辐射属于一种低能电磁辐射,具有较强生物效应的频率范围在 300 MHz~300 GHz,对生物体具有热效应和非热效应。其热效应是指它能引起生物体局部温度上升,从而引起生理生化反应;非热效应指在微波作用下,生物体会产生非温度关联的各种生理生化反应。在这两种效应的综合作用下,生物体会产生一系列突变效应^[22,23]。因而,微波也被用于多个领域的诱变育种,如农作物育种、禽兽育种和工业微生物育种,并取得了一定成果。这方面的工作贾红华等^[24]和雷肇祖等^[5]作了详尽总结,在此不再赘述。

4 讨论

从上文可以看出,为更好地发挥传统的(“经典的”)诱变育种技术的优势,许多学者在开发和应用新型物理诱变方法方面作了不懈的探索,并取得了可喜成果。但是,学者们也认识到这些方法同样难以克服传

统诱变育种技术中存在的突变无法定向、效率低、不稳定等缺点。如何克服缺点、发挥优势,把这些新的方法与其他方法结合起来组合成复合诱变方法,以及把这些方法与代谢控制育种、杂交育种,特别是基因工程育种相结合,发挥各种方法在微生物菌种改良中的优点,是广大微生物学工作者努力的方向。

[参考文献]

- [1]马向东,黄春华,周俊初. 基因体外诱变[J]. 微生物学通报, 2002, 29(1): 70~74.
- [2]Baltz R H. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*[J]. Trends in Microbiology, 1998, 6(2): 76~83.
- [3]Butler M J, Takano Bruheim E. P., et al. Deletion of *scbA* enhances antibiotic production in *Streptomyces lividans*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 61: 512~516.
- [4]施巧琴,吴松刚. 工业微生物育种学(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 1~4, 76~78.
- [5]雷肇祖,钱志良,章 健. 工业菌种选育述评[J]. 工业微生物, 2004, 34(1): 39~51.
- [6]Parekh S, Vinci V A, Strobel R J. Improvement of microbial strains and fermentation processes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 54: 287~301.
- [7]陈 宇,林梓鑫,张 峰,等. 离子注入微生物的生物效应研究[J]. 中国抗生素杂志, 1998, 23(6): 415~419.
- [8]陈 宇,林梓鑫,张 峰,等. 离子注入红霉素产生菌诱变高产菌株及其机理初步研究[J]. 中国抗生素杂志, 1997, 22(6): 410~414, 441.
- [9]许 安,姚建铭,余增亮. 离子注入改良维生素C二步发酵混合菌研究(I) 2-酮基-L-古龙酸高产菌系 IPPM-1028 的选育[J]. 工业微生物, 1998, 28(4): 21~24.
- [10]颜红梅,卫增泉,李文建. 不同能量重离子对大庆霉素产生菌绛红小单孢菌诱变的研究[J]. 中国抗生素杂志, 1998, 23(6): 462~463.
- [11]李红玉,李成华,丁新春,等. 重离子辐照对红酵母的诱变作用[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(9): 34~36.
- [12]蒋海波,王 纪,姚建铭,等. 离子注入麦角甾醇酵母选育研究[J]. 工业微生物, 2000, 30(2): 1~3.
- [13]叶枝青,姚建铭,余增亮. 离子注入选育高效植物病原菌拮抗菌JA[J]. 激光生物学报, 2001, 10(3): 218~221.
- [14]孙建荣,章 健,毛展伟. 离子束注入对衣康酸生产菌种的改良[J]. 工业微生物, 2002, 32(3): 33~35.
- [15]易福明,吴显辉,冯胜彦,等. 黄嘌呤氧化酶产生菌的离子注入诱变及其二步发酵的研究[J]. 激光生物学报, 2002, 11(2): 137~141.
- [16]向 砥,李 炯,姚建铭,等. 离子注入选育高产壮观链霉菌的研究[J]. 激光生物学报, 2002, 11(4): 276~279.
- [17]于广成,姚广华,付 林,等. 氮离子注入灰黄霉素产生菌的诱变育种[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(2): 119~120.
- [18]胡卫红,陈有为,李绍兰,等. CO₂激光辐照对酿酒酵母的诱变作用[J]. 微生物学通报, 2000, 27(1): 36~38.
- [19]韩建荣,董仙芳. 激光诱变青霉 PT95 原生质体选育类胡萝卜素高产菌株[J]. 微生物学通报, 2002, 29(2): 31~34.
- [20]周蓬蓬,余龙江,李 为,等. YAG 激光对高山被孢霉花生四烯酸产量的影响[J]. 激光生物学报, 2002, 11(5): 372~376.
- [21]彭益强,吕凤萍,贺淹才,等. 激光诱变筛选高产植酸酶黑曲霉菌株的研究[J]. 激光生物学报, 2002, 11(6): 434~437.
- [22]Leach W M. Genetic, growth and reproductive effects of microwave radiation[J]. Bull N Y Academic Medicine, 1980, 56(2): 249~257.
- [23]Kirschevink Jr. Microwave absorption by magnetite: A possible mechanism for coupling nonthermal levels of radiation to biological systems[J]. Bioelectromagnetics, 1996, 17(3): 187~194.
- [24]贾红华,周 华,韦 萍. 微波诱变育种研究及应用进展[J]. 工业微生物, 2003, 33(2): 46~49.

XIA Zhen-yuan (Agricultural Institute of Yuxi, Tobacco Institute of Province, Yuxi, Yunnan 653100, China)

WEN Meng-liang (Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology (Yunnan University), Kunming, Yunnan 650091, China)

Abstract: The biological effects of ion implantation, laser and microwave were presented, and their applications in the field of microbial strain breeding were reviewed.

Key words: microbial strain breeding; new approaches of physical mutagenesis; ion implantation; laser; microwave

49 Current Situation in the Research of Acetylcholinesterase Inhibitors

YANG Xiao-jun (Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China; The Department of Chemistry and Chemical Technology, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China)

LIU Rui-jun (The Fourth Middle School of Yan'an, Yan'an, Shaanxi 716000, China)

LI Qi-feng, ZHANG Bing-huo, ZHAO Xue-ping, WEN Meng-liang (The Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

Abstract: The current situation of acetylcholinesterase inhibitors, which are used to cure Alzheimer's disease at present, was reviewed, and new directions of developing specific drugs for the future was brought forward.

Key words: acetylcholinesterase inhibitors; Alzheimer's disease; current situation

52 Studies on Tissue Culture of Elephant-foot Yam (*Amorphophallus rivieri* Durieu)

LU Hong-xue, HU Gui-xiang, ZHOU Yi (College of Agronomy, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

PAN Na, HUANG Xiao-zhen

Abstract: The corms of *Amorphophallus rivieri* Durieu, a species of the genus *Amorphophallus*, were used as explants for tissue culture. The corms could be all induced to form callus when cultured on MS₁ medium supplemented with different hormone concentrations, but the callus induction frequency was different, and the maximal frequency was 84.62% when cultured on MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L. The callus was differentiated to bud on MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 2.0 mg/L with differential rate being 73.81%. The rootage rate was both above 78% on the medium MS+NAA 0.5 mg/L and 1/2MS+NAA 0.5 mg/L.

Key words: elephant-foot yam (*Amorphophallus rivieri* Durieu); callus; differentiation culture

55 Litter Decomposition and Nutrients(N, P, K) Return in Manchurian Ash Plantation Forest

WU Chu, ZHANG Xiu-juan (College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

WANG Zheng-quan (Forestry College, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China)

Abstract: Decomposition of fine root (≤ 2 mm) and leaves litter in a Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) stand (17 year-old) was measured using buried litterbags methods. The results showed that fine root annual decomposition amount was 663.3 kg $\cdot$ hm⁻², and may contribute 29.5% to the total litter decomposition. Amount of N, P and K return to soil from fine roots was 72.7%, 34.5%, 39.1% of total return amount. Fine roots make a substantial contribution to soil organic matter and play an important role in nutrient cycling in forest ecosystems.

Key words: Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.); litter decomposition; fine roots; nutrient return