阿维链霉菌种内原生质体融合选育仅产阿维菌素 B 的高产菌株

陈 芝 温 嘉 宋 渊* 文 莹 李季伦*

(中国农业大学生物学院微生物系, 北京 100094. * 联系人, E-mail: lijilun@cau.edu.cn; syuan@cau.edu.cn)

摘要 在阿维菌素的 8 个组分中, B1 组分具有最高的杀虫活性, 且毒性最小, 被广泛应用于农业和畜牧业生产. 本研究对两株阿维链霉菌(阿维菌素高产菌株 76-05 和仅产阿维菌素 B 不产寡霉素基因工程菌 73-12)进行了种内原生质体融合, 用以选育仅产阿维菌素 B 不产寡霉素的高产菌株, 获得了两株具有双亲优点的重组菌株 F23 和 F29. 两重组菌株均只产阿维菌素 B 组分不产寡霉素, 而且阿维菌素的产量有很大的提高, 分别是亲本菌株 76-05 产量的 84.20% 和 103.45%, 是亲本菌株 73-12 的 2.66 和 3.50 倍. F23 和 F29 均为遗传稳定的原养型菌株, 与亲本菌株高产菌株 76-05 相比, F29 对发酵条件比较宽容. F23 和 F29 高产阿维菌素 B 不产阿维菌素的其他组分和寡霉素的特性有利于阿维菌素的生产, 而菌株 F29 对发酵条件相当宽容更有利于其在工业生产中的应用.

关键词 阿维链霉菌 原生质体融合 阿维菌素 寡霉素

阿维菌素是由阿维链霉菌产生的一组具有相似结构的十六元环大环内酯类抗生素, 有很强的杀体内外寄生虫活性^[1], 是目前最有效的杀虫剂之一, 被广泛应用于农业和畜牧业生产中. 阿维菌素是由 8 个结构类似的组分组成, 分别为 A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a 和 B2b, 其中 B1 具有最高的杀虫活性, 且毒性最小^[2]. 阿维链霉菌除了产生阿维菌素外, 还产生一个二十六元环大环内酯类化合物——寡霉素. 寡霉素是哺乳动物细胞氧化磷酸化的抑制剂, 具有很强的毒性^[3].

鉴于阿维菌素 B 组分的杀虫活性高于阿维菌素 A 组分, 在阿维链霉菌中选择性合成阿维菌素 B 组分具有重要的意义. 日本 Kitasato 小组通过诱变及其原生质体融合获得了仅产阿维菌素 B, 仅产阿维菌素 B1a 和 B2a 两个组分和仅产阿维菌素 B2a 的菌株^[4]. 由于阿维菌素和寡霉素的生物合成基因簇已被克隆和鉴定^[5~7], 因此通过基因阻断的手段构建仅产有效组分的基因工程菌株成为可能. 在以前的研究中, 通过对阿维链霉菌 76-9 中的 *aveD* 基因和整个寡霉素 PKS 基因 (*olmA*) 分别进行基因缺失, 我们获得了一株仅产阿维菌素 B 不产寡霉素的基因工程菌 73-12^[8,9]. 以该菌株进行生产, 纯化阿维菌素 B 时就避免了繁琐的阿维菌素和寡霉素以及阿维菌素 A 和 B 组分的分离步骤,

简化了提取工艺, 提高了产品质量. 然而, 阿维链霉菌 73-12 的产量不高限制了它在工业生产上的应用.

原生质体融合技术在链霉菌的菌株改良中被广泛应用. 通过原生质体融合技术也获得了一些具有优良性状的新的中间产物和杂合抗生素^[10,11]. 链霉菌的种内原生质体融合的融合率很高, 在天蓝色链霉菌中可高达 10%~15%, 大多数链霉菌的融合率一般在 0.5%~17%^[11]. Hopwood 和 Wright^[12] 研究表明, 在原生质体融合之前通过 UV 照射灭活原生质体使存活率约为 1% 时, 重组率可提高 2~10 倍. 这可能是 UV 照射会在原生质体的染色体上引入致死突变, 具有不同致死位点的原生质体可通过融合而互补. 链霉菌原生质体的高融合率使得原生质体融合技术非常适用于链霉菌的菌株选育. 可将原生质体融合后所获融合子的孢子(单倍体)悬液涂于非选择性培养基, 然后对所有的后代进行随机筛选^[11]. 近年来, 在原生质体融合技术的基础上, 基因组改组 (genome shuffling) 技术的建立, 为在弗氏链霉菌和乳杆菌中通过对多株正向突变株进行原生质体回归融合实现快速育种提供了方便^[13,14].

为获得仅产阿维菌素 B 不产寡霉素的高产菌株, 本研究在阿维菌素高产菌株 76-05 和仅产阿维菌素 B 不产寡霉素的基因工程菌 73-12 之间进行了种内原生

质体融合以选育具有双亲优良性状的菌株。通过原生质体融合,我们获得了两株稳定的重组菌株F23和F29,均为仅产阿维菌素B不产寡霉素的高产菌株。

1 材料与方法

() 菌株。阿维链霉菌 76-05,是经多次常规诱变育种而获得的阿维菌素高产菌株,它产生8个组分的阿维菌素和寡霉素。阿维链霉菌 73-12 只产阿维菌素B不产寡霉素^[8,9]。F7, F20, F23 和F29是阿维链霉菌 76-05 和 73-12 原生质体融合后所获得的重组子。

() 培养基。阿维链霉菌的产孢培养基为酵母膏-麦芽膏-可溶性淀粉培养基(YMS)^[15]。用于培养菌丝体制备原生质的生长培养基为改良的YEME,原生质体再生培养基为RM14^[16]。用于阿维菌素发酵的种子培养基含:30 g/L可溶性淀粉,4 g/L酵母膏,2 g/L大豆蛋白胨,5 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ^[17];发酵培养基:70 g/L玉米淀粉,15 g/L豆饼粉,10 g/L酵母粉,0.5 g/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L CaCO_3 。玉米淀粉在灭菌前用0.05%淀粉酶液化。

() 原生质体融合。阿维链霉菌 76-05 和阿维链霉菌 73-12 的原生质体制备分别参照MacNeil和Klapko^[16]的方法进行。原生质体融合按照文献^[18]的方法,作适当改动。将两亲本菌株的原生质体悬液调至浓度基本相同,等体积混合,2000×g离心7 min收集原生质体。原生质体用5 mL P20 缓冲液洗涤两遍后加入50% PEG 1000 (用 P20 配置),并用微量进样器轻吸几次,以使其至完全悬浮,室温放置2 min。悬液涂布于RM14 培养基平板上,28 °C培养10 d。由于阿维链霉菌在RM14 培养基上不能形成孢子,待菌落在RM14 平板上再生完全后影印到YMS平板上以恢复产孢。收集YMS平板上的单倍体孢子,做适当稀释后涂布于YMS平板以分离单菌落。将单菌落划线接种于YMS平板,用于阿维菌素产量的测定。

() 阿维菌素的TLC分析。将阿维链霉菌出发菌株及其融合子在YMS平板上分别生长7 d,用打孔器取菌块转移到1.5 mL的离心管中,加入500 μL 乙酸乙酯,剧烈振荡0.5 h,离心除去沉淀以提取阿维菌素。将提取物浓缩至200 μL 。各取10 μL 点至硅胶层析板(0.2 mm 硅胶 HSG F-254, 10 cm × 10 cm)上。层析板用正己烷:异丙醇(90:10, 体积比)推动剂展开2次。展开后的层析板用凝胶分析仪于254 nm测紫外吸收带。

() 阿维菌素的摇瓶发酵^[17]。将阿维链霉菌出发菌株及其融合子首先接种到含有50 mL种子培养基的250 mL摇瓶中,在28 °C振荡(180 r/min)培养24 h后,以5%的接种量将种子液接种到含有100 mL发酵培养基的500 mL摇瓶中。在28 °C振荡(220 r/min)培养10 d后,放瓶测定阿维菌素和寡霉素的产量。

() 阿维菌素和寡霉素的HPLC检测。取0.5 mL发酵液,加入4.5 mL甲醇,充分振荡浸泡30 min,2500×g离心10 min,上清液直接用于HPLC (WatersTM 600)分析。HPLC分析采用C18反相柱(10 μm ; 4.6 i.d. mm × 150 mm),流动相为甲醇-水(85:15),流速为1.0 mL/min。阿维菌素和寡霉素的检测波长均为246 nm。

() 融合子的性状。将融合子及其出发菌株分别接种到MM培养基以检验它们是否为原养型^[18]。在28 °C培养7 d后观察生长情况。融合子和出发菌株的生长曲线的测定如下:培养48 h的液体培养物定量后用于接种100 mL的YMS液体培养基,在28 °C振荡(180 r/min)培养,定时取10 mL培养物以测定细胞的干重。

() PCR扩增。引物1 (P1, 5'-GGGGTGTCTGCATAGCTCG-3')位于 *aveD* 基因起始密码子上游107 nt,引物2 (P2, 5'-GTGAGCGGCGCGTCGACAG-3')位于 *aveD* 基因终止密码子下游63 nt,用于 *aveD* 基因的PCR扩增。阿维链霉菌 73-12 中的0.99 kb *aveD* 基因为0.72 kb内部缺失的 *aveD* 片段所取代。因而,如以P1和P2进行扩增,则完整的 *aveD* 基因和内部缺失的 *aveD* 基因的扩增片段应分别为0.99和0.72 kb。引物3 (P3, 5'-CGTCAACACGGCACTCAC-3')位于 *olmA1* 基因起始密码子下游1101 nt,引物4 (P4, 5'-ATAGCGATCGTCGGGATGG-3')位于 *olmA4* 起始密码子下游64 nt,用于内部缺失的 *olmA* 基因的扩增。完整的寡霉素PKS基因长90 kb,在阿维链霉菌 73-12 中它为1.25 kb,包含622 bp的 ΔolmA1 和634 bp的 ΔolmA4 的DNA片段所取代。因而如以P3和P4为引物进行扩增,则内部缺失的 *olmA* 基因的扩增产物应为1.25 kb;而完整的 *olmA* 长约90 kb,由于太大,在以下面所提到的条件进行扩增时无法获得扩增产物。扩增条件为:95 °C, 45 s, 60 °C, 45 s, 72 °C, 1 min, 25个循环;72 °C 延伸5 min。

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2007-52-3-297>

2 结果

2.1 原生质体融合

本研究在阿维链霉菌 73-12 和阿维链霉菌 76-05 之间分别进行了直接原生质体融合和灭活原生质体后融合. 不经灭活直接进行原生质体融合的操作见材料与方法部分. 在灭活原生质体时, 考察了不同 UV 照射时间对致死率的影响. 阿维链霉菌原生质体置于 30 W 的紫外灯下, 距离 30 cm 照射 1 min 存活率约为 1%. 经 UV 照射 1 min 后, 等量的阿维链霉菌 73-12 和阿维链霉菌 76-05 的原生质体马上进行融合. 融合后均在 RM14 平板上进行再生, 随后再生完全的菌落被影印于 YMS 培养基以恢复产孢. 在 YMS 培养基平板上, 阿维链霉菌 76-05 形成少量的灰色孢子, 而阿维链霉菌 73-12 产生丰富的浅灰色孢子. 鉴于阿维链霉菌 73-12 和 76-05 的产孢情况不同, 为提高获得目的融合子的几率, 我们选取那些在 YMS 影印平板上兼有阿维链霉菌 73-12 和 76-05 两种孢子颜色的单菌落, 收集它们的孢子以进行随机筛选. 将收集的单倍体孢子涂布于非选择性的 YMS 培养基平板上以

分离单菌落用于快速随机筛选. 从未经 UV 灭活直接原生质体融合处理中选取了 44 个单倍体后代用于 TLC 分析, 检测阿维菌素的合成情况. 从经 UV 灭活原生质体融合处理中选取了 49 株融合菌落和 68 株单倍体后代分别进行 TLC 分析, 以检测阿维菌素的合成情况.

2.2 阿维菌素的 TLC 分析

采用在 YMS 平板上培养结合 TLC 分析来快速检测融合子后代产生阿维菌素的情况. 对未经 UV 灭活直接原生质体融合处理中选取的 44 个单倍体后代的 TLC 分析表明, 在所测的 44 株菌中, 23 株只产生阿维菌素 B, 其中 8 株的阿维菌素产量高于亲本菌株阿维链霉菌 73-12 的产量(图 1(a)); 14 株产生 8 个组分的阿维菌素, 其产量相当于或低于亲本菌株阿维链霉菌 76-05 的产量; 还有 7 株融合子不再产生阿维菌素(表 1).

对经 UV 灭活原生质体融合处理中选取的 49 株融合子菌落和 68 株单倍体后代也进行了 TLC 分析, 结果相当奇怪. 在检测的 49 株融合子菌落中, 33 株

图 1 阿维菌素的 TLC 分析
(a) 未经 UV 灭活直接原生质体融合处理中的单倍体后代的 TLC 分析图谱. 1, 阿维链霉菌 73-12; 2~9, 不同的单倍体后代; 10, 阿维链霉菌 76-05.
(b) 经 UV 灭活原生质体融合处理中的融合子菌落的 TLC 分析图谱. 1~10, 不同的融合子菌落. (c) 经 UV 灭活原生质体融合处理中的单倍体后代的 TLC 分析图谱. 1~10, 不同的单倍体后代. 阿维链霉菌 76-05 产生的 8 个组分的阿维菌素在 TLC 平板上被展开为 4 条带, 在 254 nm 的紫外灯下可被检测, 从上至下依次为 A1, A2, B1 和 B2; 阿维链霉菌 73-12 产生的 4 个组分的阿维菌素 B 在 TLC 平板上被展开成两条带 B1 和 B2. 箭头所示为仅产阿维菌素 B 4 个组分的高产菌株

表 1 融合子的阿维菌素合成情况

菌株	阿维菌素合成			总菌数/个
	仅 Av ^{a)} B (产量提高)	Av A 和 B	不产 Av	
单倍体后代(未经 UV 灭活)	23 (8)	14	7	44
融合菌落(UV 灭活)	33 (13)	13	3	49
单倍体后代(UV 灭活)	12 (2)	3	53	68

a) Av, 阿维菌素, 余同

仅产阿维菌素 B, 其中 13 株的阿维菌素产量明显高于亲本菌株阿维链霉菌 73-12 (图 1(b)); 13 株产生 8 个组分的阿维菌素, 其中 5 株的阿维菌素产量明显地高于亲本菌株阿维链霉菌 76-05, 4 株的阿维菌素产量极低; 3 株不再产生阿维菌素(表 1). 然而, 在 68 株单倍体后代中, 12 株仅产阿维菌素 B, 其中大多数的阿维菌素产量相当于或低于亲本菌株阿维链霉菌 73-12; 3 株产生 8 个组分的阿维菌素, 产量均相当于或低于亲本菌株阿维链霉菌 76-05; 大部分的单倍体后代不再产生阿维菌素(表 1, 图 1(c)). 紫外灭活原生质体融合所获的融合子菌落和单倍体后代的阿维菌素产量具有明显差异, 推测原因可能是原生质体融合前的紫外照射所造成的. UV 灭活原生质体一方面提高了原生质体融合的融合率; 但 UV 照射可能也同时增加了阿维链霉菌染色体的遗传不稳定性, 并在阿维链霉菌的染色体上引入突变, 染色体的遗传不稳定性突变可能是单倍体后代中不产阿维菌素突变株高频率出现的原因.

2.3 融合子高产仅产阿维菌素 B

对经 TLC 初筛得到的仅产阿维菌素 B 的高产融合子及其亲本菌株阿维链霉菌 76-05 和 73-12 分别进行摇瓶发酵, 通过 HPLC 分析了发酵液中阿维菌素和寡霉素产生情况. 获得了 4 株阿维菌素产量明显提高且只产阿维菌素 B 的融合子(F7, F20, F23 和 F29), 与亲本菌株阿维链霉菌 73-12 相比, 它们的阿维菌素产量分别提高了 1.34, 1.78, 2.66 和 3.50 倍. 有趣的是, 这 4 株菌均是未经紫外灭活处理直接原生质体融合所获得的. 对此的解释如前面所提到的, UV 照射可能增加了阿维链霉菌染色体的遗传不稳定性, 并在阿维链霉菌的染色体上引入突变, 因而我们未能在灭活原生质体融合中获得目的的高产菌株. F7, F20, F23 和 F29 与亲本菌株 73-12 相同, 均只产生阿维菌素 B 4 个组分(B1a, B1b, B2a 和 B2b), 不产寡霉素. 其中 F23 和 F29 的阿维菌素产量与阿维链霉菌 73-12 相比分别提高了 2.66 和 3.50 倍, 是阿维链霉菌 76-05 的 84.20%和 103.45%(图 2). 因而选取 F23 和 F29 做进一步的研究.

2.4 融合子的原养型及生长曲线

与它们的原养型亲本菌株相似, 融合子 F23 与 F29 都能在基本培养基上生长. 他们的生长曲线与亲本菌株 73-12 的稍有不同, 而类似于 76-05 的生长曲

图 2 发酵液的 HPLC 分析

(a) 亲本菌株阿维链霉菌 73-12 发酵液的 HPLC 分析图谱, 73-12 仅产阿维菌素 B 的 4 个组分, 不产寡霉素; (b) 亲本菌株阿维链霉菌 76-05 发酵液的 HPLC 分析图谱, 76-05 产生寡霉素和 8 个组分的阿维菌素; (c) 融合子 F23 发酵液的 HPLC 分析图谱, F23 仅产阿维菌素 B 的 4 个组分, 不产寡霉素. 融合子 F29 发酵液的 HPLC 分析图谱与 F23 的相近

线. 在稳定期, F23 和 F29 的生物量比 73-12 的稍高, 而与 76-05 的生物量大致相当(数据未显示).

2.5 融合子的遗传鉴定

阿维链霉菌 73-12 染色体上的 *aveD* 基因和 *olmA* 基因均是内部缺失的,而在阿维链霉菌 76-05 中相应的基因是野生型的(图 3(a)).为鉴定融合子中这些基因的情况,以 F23, F29 及其亲本菌株的总 DNA 作为模板,分别以 P1/P2 和 P3/P4 为引物进行 PCR,扩增 *aveD* 和内部缺失的 *olmA* ($\Delta olmA1 + \Delta olmA4$)(图 3(b)).以 P1/P2 为引物进行 PCR 扩增,自菌株阿维链霉菌 76-05 和 73-12 分别扩增出预期大小的 0.99 和 0.72 kb 的 DNA 片段;而以 F23 和 F29 的总 DNA 为模板也扩增出 0.72 kb 的 DNA 片段,表明在这两个融合子中 *aveD* 基因是内部缺失的.以 P3/P4 为引物进行 PCR 扩增,以 76-05 的总 DNA 为模板没有扩增条带,而以 73-12 的总 DNA 为模板扩增出预期大小的 1.25 kb 的 DNA 片段;同样也自 F23 和 F29 中扩增出 1.25 kb 的 DNA 片段,表明在这两个融合子中 *olmA* 基因也是内

部缺失的.对所得的扩增产物均进行了测序验证.融合子的 PCR 扩增结果与其发酵液 HPLC 分析只产阿维菌素 B 不产寡霉素的结果相一致,表明在融合子中确实发生了遗传重组.

2.6 融合子的遗传稳定性

为考察 F23 和 F29 的遗传稳定性,将它们连续传代 5 次,并对每一代都进行摇瓶发酵以测定阿维菌素的发酵单位.结果表明, F29 和 F23 的第 2 代到第 6 代中阿维菌素的发酵单位与第 1 代相比基本相同,表明这两个融合子是遗传稳定的.在摇瓶发酵实验中,我们发现 F29 菌株对发酵条件,如温度和通气等的要求比亲本菌株 76-05 和 73-12 更为宽容.76-05 在发酵过程中对于发酵条件如温度和通气非常敏感,温度稍高或几分钟的通气不足就会造成阿维菌素产量的急剧下降.而在一次发酵过程中,由于温度控制不理想,高于最适温度 28 $^{\circ}\text{C}$,发酵结束后发现阿维链霉菌

图 3 *aveD* 基因和 *olmA* 基因的 PCR 扩增

(a) 用于 PCR 验证的引物(P1/P2, P3/P4). (b) F23, F29 和亲本菌株的 PCR 产物电泳图谱. 2~5, 所用引物为 P1/P2; 7~10, 所用引物为 P3/P4. 1 和 6, 1-kb DNA Ladder Marker; 2 和 7, 阿维链霉菌 73-12; 3 和 8, 阿维链霉菌 76-05; 4 和 9, F23; 5 和 10, F29

76-05 的阿维菌素产量仅有 505 $\mu\text{g/mL}$, 不到其最高发酵水平的 10%, 73-12 几乎没有产量, 而 F29 的阿维菌素产量为 2743 $\mu\text{g/mL}$, 因而可见 F29 对发酵条件较亲本菌株更为宽容. F29 对发酵条件比较宽容则更有利于该菌株在工业生产上的应用.

3 讨论

工业微生物的菌种改良自最初的随机筛选发展到利用代谢工程进行理性育种. 虽然传统菌株选育卓有成效, 但是具有工作量大, 费时费力的特点. 已有很多通过种内原生质体融合提高抗生素产量的报道^[11]. 本研究在基因工程菌阿维链霉菌 73-12 (*aveD^{olmA}*) 和阿维菌素高产菌株阿维链霉菌 76-05 之间进行原生质体融合以选育仅产阿维菌素 B 的高产菌株, 获得了两株高产阿维菌素 B 不产寡霉素的融合子 F23 和 F29. 本研究可作为通过原生质体融合进行理性育种的尝试. 遗传稳定性实验表明, 这两株融合子是遗传稳定的原养型菌株. 其高产阿维菌素 B 不产阿维菌素其他组分和寡霉素的特性有利于阿维菌素的生产, 而菌株 F29 对发酵条件相当宽容更有利于其在工业生产上的应用.

本研究我们发现阿维链霉菌种内原生质体融合的融合率相当高(10%). 虽然 UV 灭活原生质体可以进一步提高阿维链霉菌的融合率, UV 照射也会诱发融合子的遗传不稳定性. 因而在利用原生质体融合手段进行阿维链霉菌的菌株改良时我们不建议采用 UV 灭活原生质体. 鉴于阿维链霉菌的原生质体融合的高融合率, 应用基因组改组技术进行阿维链霉菌的快速菌株改良应该也是可行的.

参 考 文 献

- 1 Burg R W, Miller B M, Baker E E, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Producing organisms and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979, 15: 361—367
- 2 Egerton J R, Ostling D A, Blair L S, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Efficacy of the B1a component. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979, 15: 372—378
- 3 Pinna L A, Lorini M, Moret V, et al. Effect of oligomycin and succinate on mitochondrial metabolism of adenine nucleotides. *Biochim Biophys Acta*, 1967, 143: 18—25
- 4 Ikeda H, Omura S. Control of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* for the selective production of a useful component. *J Antibiot*, 1995, 48(7): 549—562
- 5 Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, et al. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(17): 9509—9514[DOI]
- 6 Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 526—531[DOI]
- 7 Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, et al. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(21): 12215—12220[DOI]
- 8 陈芝, 文莹, 宋渊, 等. 阿维链霉菌中 *aveD* 基因缺失对阿维菌素合成的影响. *微生物学报*, 2002, 42(5): 534—538
- 9 张晓琳, 陈芝, 赵金雷, 等. 阿维菌素 B 产生菌寡霉素合成阻断株的构建. *科学通报*, 2004, 49(1): 90—94
- 10 Zhou X F, Zhou Q. Interspecific protoplast fusion of *Streptomyces hygroscopicus* var. *yingchengensis* with *Streptomyces qingfengmyceticus* and biological characterization of their recombinants. *Chin J Biotechnol*, 1989, 5: 161—166
- 11 Baltz R H. Genetic recombination by protoplast fusion in *Streptomyces*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1999, 22: 460—471[DOI]
- 12 Hopwood D A, Wright H M. Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol*, 1978, 162: 307—317
- 13 Zhang Y X, Perry K, Vinci V A, et al. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, 2002, 415: 644—646[DOI]
- 14 Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, et al. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 707—712[DOI]
- 15 Ikeda H, Kotaki H, Tanaka H, et al. Involvement of glucose catabolism in avermectin production by *Streptomyces avermitilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988, 32: 282—284
- 16 MacNeil D J, Klapko L M. Transformation of *Streptomyces avermitilis* by plasmid DNA. *J Ind Microbiol*, 1987, 2: 209—218[DOI]
- 17 宋渊, 曹贵明, 陈芝, 等. 阿维菌素高产菌株的选育与阿维菌素 B1 的鉴定. *生物工程学报*, 2000, 16(1): 31—35
- 18 Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, et al. *Practical Streptomyces genetics*. Norwich: The John Innes Foundation, 2000