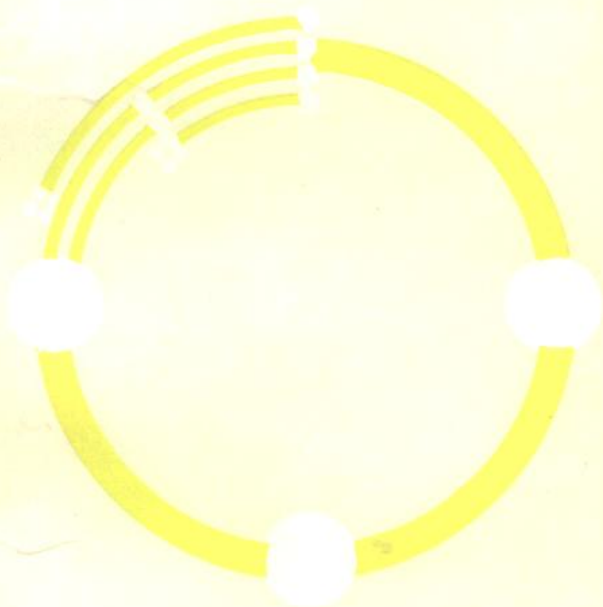


酵母遗传育种法

(杂交、多倍化)



[苏] K·B·柯西可夫 著

胡嗣明 张天杭 译

刘同昌校

轻工业出版社

酵母遗传育种法

(杂交, 多倍化)

[苏] K.B.柯西可夫著

胡嗣明 张天杭 译

刘同昌 校

轻工业出版社

内 容 提 要

本书综合了与育种有直接关系的产孢酵母在遗传学领域研究中的主要成就。由于遗传育种法的研究和应用,获得了供食品工业使用的酵母生产杂种和多倍体菌株,这些菌株是活性酶的综合体,并已被成功地应用于酵母、酒精和面包工厂生产中。

本书可供遗传学工作者、育种工作者、微生物学工作者、生物化学工作者以及从事食品工业的工作人员参考。

Генетические Методы Селекции Дрожжей (гибридизация, полиплоидия)

К. В. Косиков

издательство «науча»

МОСКВА

1979

本书根据莫斯科科学出版社1979年第一版译出

酵母遗传育种法

(杂交, 多倍化)

[苏] К. В. 柯西可夫 著

胡嗣明 张天杭 译

刘同昌 校

轻工业出版社出版

(北京广安门南滨河路25号)

轻工业出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

各地新华书店经售

787×1092毫米1/32 印张: 4²⁰/₃₂; 字数: 98千字

1987年12月 第一版第一次印刷

印数: 1—3,500 定价: 1.20元

统一书号: 15042·2151

ISBN 7-5019-0213-5/T·S·0135

序 言

酵母菌是单细胞真菌，遍布于地球上，在土壤、水、各种食品、果皮、花蜜以及树汁等处，都能发现酵母菌。

自古以来，人们就在自己的生活中应用发酵产物，当时并不知道有酵母菌的作用。例如，亚西里亚人在公元前3500年就会制造葡萄酒，巴比伦人酿造啤酒和泡制腌菜的方法也很成熟，但是他们不知道有酵母菌或酶的存在，也不知道酵母菌和酶在这些过程中的作用。

1680年，雷文虎克用自制的放大镜观察发酵形成的沉淀——酵母时，发现它们基本上是由典型的椭圆形细胞所组成。这样又过了150多年，路易·巴斯德（1857）证明酵母是直接参与酒精发酵的微生物，为对酵母进行现代科学研究开辟了道路。

若干世纪以来，在传统产品的工业生产中，一直都是应用酵母，很少有过变化。至今在（1）面包工业；（2）酒精、酒类和啤酒生产中，酵母菌仍然起着主要的作用。近年来，酵母的应用已从这些古老的领域扩大到其他部门；（3）直接应用酵母菌体或用自溶法制成酵母膏作为营养品或饲料；（4）作为药用维生素（特别是复合维生素B、氨基酸等）以及蛋白质-维生素制剂；（5）制取核酸、酶和其他物质。

上述生产的产品数量和质量，一方面决定于原料的质量和工艺技术水平；另一方面决定于酵母菌株的遗传特性及其酶系特性等。不同生产工艺所使用的酵母菌株是各不相同的，在同一生产（例如面包工业、酒精生产、葡萄酒酿造等）

中所使用的各个菌株之间也有根本的差异。这些菌株不仅具有优良特性，也具有降低生产指标的不良性状。

最近三、四十年来，在酵母遗传学和育种学方面取得了很大成就。毫无疑问，遗传学方法是现今最有效的酵母育种方法。但是在各种具体情况下，要根据研究的目的和任务而采用某种遗传学方法。

单细胞的产孢子酵母菌，对遗传学和育种学的研究具有很大优越性：（1）它们属于真核生物，具有分子遗传学概念的共性；（2）具有有性过程，并能进行减数分裂，形成配子，而且具有交配型等位基因，在不同属、种的酵母之间，可以广泛地进行杂交；（3）由单孢子得到的单倍体菌株，通常具有生命力，其杂种可以进行四分体分裂；（4）酵母属（*Saccharomyces*）大多数能够突变，可凝聚成团，可组成染色体遗传图。在各属酵母的遗传研究和育种工作中，能广泛而成功地利用遗传标记（突变）；（5）用不同交配型的各种倍性的营养细胞杂交，能够得到更高倍性的多倍体；（6）用产孢子酵母（酵母属和裂殖酵母属（*Schizosaccharomyces*））有获得远缘杂种的可能性。

多年以来，著者对产孢酵母进行了遗传学和育种学的研究。1947年发表了研究报告。1954年又发表了专题学术报告，综述了这个时期的研究成果。

在最近的研究中，提出了有关研究和应用酵母遗传育种的某些理论问题和实验数据。近二十年来，著者领导和直接参加了有实际意义的酵母杂种和多倍体的研究，将所得杂种和多倍体中的高产优良菌株应用到酒精厂和酵母厂等食品工业部门。研究结果已分别发表在许多杂志和论文集中。Косиков所采用的酵母杂交和多倍化的方法，已被研究产孢酵

母的育种工作者成功地加以应用。为了说明在实际中可以应用和如何应用这些方法，Косиков将主要研究结果综述于专题报告中。

书的第一部分，扼要地叙述了遗传学的某些问题，这是遗传育种法的基础。第二部分，叙述了杂交和多倍化的基本方法和研究结果。这些结果主要是研究生产上酵母属的各酵母菌株所得到的。

目 录

酵母育种的遗传学基础	(1)
发育周期、单倍期和二倍期.....	(1)
孢子的形成.....	(4)
有性过程.....	(9)
杂交的技术和方法.....	(14)
多倍化.....	(29)
突变, 染色体遗传图.....	(34)
细胞质的遗传性.....	(37)
远缘杂交.....	(40)
酵母杂交和多倍化的方法	(49)
第一代杂种, 近亲交配和杂种优势.....	(49)
第二代杂种, 分裂.....	(53)
生产用杂种的获得.....	(56)
用糖蜜制造酒精时, 能完全发酵棉子糖的酵 母杂种.....	(58)
即适合于糖蜜制造酒精又可用于面包工业的 酵母杂种.....	(72)
谷物-马铃薯原料酒精发酵用酵母菌种和杂 种.....	(84)
面包工业用酵母杂种.....	(91)
增强麦角甾醇合成能力的面包酵母杂种.....	(101)
啤酒工业用的酵母杂种.....	(108)
各种倍性的酵母菌株和杂种的生物量.....	(110)

酵母——营养品和饲料的组成部分.....	(114)
人类未来的营养——酵母.....	(115)
参考文献.....	(116)

酵母育种的遗传学基础

发育周期、单倍期和二倍期

用不同科的酵母属和裂殖酵母属的酵母种作为遗传学研究的主要对象。前者是以芽生方式进行繁殖，后者是用形成横隔膜的方法进行裂殖。此外，酵母属和裂殖酵母属还可以根据发育期、单倍体与二倍体的世代交替来加以区分。裂殖酵母属(粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*))发育史的生长期是单倍体，只在短时间内变为二倍体。这种情况，只发生在菌体繁殖的末期，即培养基内营养耗尽时，两个单倍体细胞相互融合。随着细胞的融合(质配)而发生细胞核的融合(核配)，结果形成了二倍体合子。然后，很快地进行减数分裂，并形成孢子。这些孢子是单倍体的，当其在新鲜培养基中发芽时，重新恢复了发育周期的生长单倍期。

酿酒酵母(*Sacch.cerevisiae*)及酵母属的其他种的营养期是二倍体，在菌体发育末期或在特殊培养基上，二倍体细胞通常形成含单倍体孢子的子囊。当这些子囊孢子在新鲜培养基上发芽时，两个孢子互相接合，形成二倍体合子。合子又立即开始出芽繁殖，结果恢复了繁殖的二倍期。

人们早已知道酵母的有性过程，但长期不了解酵母生活周期中还包括单倍期、二倍期及世代交替。经过 Winge

(1935)、Winge和Laustsen (1937、1939a) 以及C.C. Lindegren、G.Lindgren (1943a) 等人的研究, 最后才证明酵母的许多种都存在着有性过程、同宗配合、异宗配合和世代交替。

酵母菌株是属于单倍体还是二倍体, 取决于细胞的无性繁殖发生在什么阶段。如上所述, 裂殖酵母属细胞的无性繁殖发生在单倍期, 即细胞具有一组染色体; 而酵母属细胞通常都是二倍体, 即具有两组染色体。必须指出, 有些酵母种的单倍期与二倍期的相互交替不能明显地分清。酿酒酵母异宗配合菌株细胞的营养生长, 可在单倍期或二倍期进行, 故其培养物是含有单倍体和二倍体细胞的混合物 (Winge、Roberts, 1958a)。

对于同宗配合菌株单倍体孢子的后代, 将迅速地产生二倍化, 保持比较稳定的二倍期。Косиков (1947、1948) 研究过的球形酵母 (*Sacch.globosus*)、椭圆酵母 (*Sacch. ellipsoideus*) 和酵母属的某些种, 都属于这种类型。粟酒裂殖酵母能保持稳定的单倍期。酵母属单倍体细胞在许多特征方面是与二倍体细胞有区别的。通常, 单倍体细胞小于二倍体细胞, 呈球形。酿酒酵母和椭圆酵母的单倍体细胞, 特别明显地具备这些形态学特征。二倍体细胞通常是腊肠形或椭圆形。单倍体细胞与二倍体细胞不同, 它不能形成孢子。检测染色体的数目能直接验证是否属于单倍期。但是在没有提出用统计染色体数目以确定酵母倍性的准确方法以前, 对于酵母染色体组的细胞学研究遇到了很大的困难。

用遗传控制法可以确定酵母异宗配合菌株的单倍体细胞和单倍体孢子的二倍化过程。Winge、Laustsen (1939b) 发现, 类酵母属 (*Saccharomycodes*) 存在交配型 (或

适应型) 基团。C.C.Lindegren、G.Lindegren(1943a) 发现了*Saccharomyces*的交配型基因。当四孢子子囊中的每一个孢子形成单倍体细胞的菌落时, 其中两个菌落属于一种交配型, 称之为a; 而另外两个菌落属于反交配型, 称之为 α 。当培养物a与培养物 α 混合时, 发生了交配, 这时形成的合子萌发成二倍体细胞。二倍体细胞再形成孢子时, 又重新分裂为a型或 α 型。在Косиков实验室, 由各种杂种和酵母属得到了大量的二倍体或单倍体的单孢子菌株(Косиков, 1954; Раевская, 1955; Косиков, Бочаров, 1965; 等等)。当不同类型的细胞混合时, 在多数细胞中测定了交配型等位基因。在Косиков和其他实验室, 都是从各种交配型的菌株中, 选出活性最强者, 作为试验菌株(由Rasse X获得的菌株为X-63 α 和X-354a; 由杂种196获得的菌株为196-45 α 和196-51a)。

对各种酵母菌种可用不同的方法使其从单倍期变为二倍期, 这主要决定于菌株是同宗配合还是异宗配合。形成二倍期的四个主要方法如下:

1. **发芽孢子子核的融合** 单倍体孢子发芽时, 经第一次有丝分裂形成两个子核, 这些核在发芽孢子内融合形成二倍期。Winge、Laustsen (1937) 在研究丹麦面包酵母时, 发现了这种获得二倍期的方法, 并称之为直接二倍化。他们指出, 用这种方法二倍化时, 因近亲交配而严重退化。这种二倍化细胞所产生的孢子, 其发芽能力很低。著者把这种现象称为近亲交配——繁殖时细胞质成分(可能是线粒体)抑制引起的细胞质效应。

2. **萌发孢子的融合** 并排和同时发芽的两个单倍体孢子融合而成合子, 合子充满原生质后进行核配合, 开始二倍

化营养期，这种二倍化的方法是研究酵母属和类酵母属时所发现的。

3. 反向或同向交配型细胞的融合 异宗配合菌株的单倍体孢子能稳定地形成营养繁殖细胞的单倍体菌落。当反向交配型单倍体细胞接触时，便产生合子而形成二倍体。Winge、Roberts (1949) 指出，当二倍化基因D存在时，能产生同向交配型细胞的融合。

4. 细胞和孢子的融合 发芽孢子形成幼芽后，与相连的发芽孢子接合。由此可能产生后天变异。同宗配合菌株的单孢子形成三个细胞，其中一个细胞与母孢子融合，其余的两个细胞自身融合在一起。发芽孢子也可以同其他子囊孢子产生的某一个单倍体细胞进行融合。细胞和孢子均可进行人工交配。

孢子的形成

酵母产生孢子的能力对遗传学和分类学具有重大意义。孢子的形成是酵母属酵母的基本特性之一。各个种和属具有不同形状和不同数量的孢子。核减数分裂（成熟分裂）的结果，在细胞内部（子囊）形成子囊孢子，标志着孢子的形成。子囊内孢子的数目是不固定的。象酵母属、类酵母属、粟酒裂殖酵母等大多数酵母，最多有四个孢子。某些酵母，例如日本八孢酵母 (*Octosporus japonicus*) 通常在一个子囊内形成八个孢子。但是对于研究得最多的酵母属酵母，常常遇到少于四个孢子（1~3个）的子囊，而在少数情况下，可能形成多于四个孢子（5~8个）的子囊。

众所周知，由于细胞内二倍体核的减数分裂，形成了四个单倍体核，其中每一个核都是形成单孢子的基础。这时，如形成少于四个孢子的子囊，可能是子囊中有些核没有参与形成孢子的过程 (Pontetract, Miller, 1962)，或者是一个孢子含有两个核 (Winge, Roberts, 1950, 1954)。如果形成多于四个孢子的子囊，可能是由于核的进一步分裂的结果。象日本八孢酵母 (*Octosporomyces japonicus*) 等在减数分裂之后，接着就进行有丝分裂，通常形成八个孢子的子囊 (Widra, De Lamater, 1955)。在正常情况下，酵母最多能形成四个孢子的子囊。按照核分裂的本质，对上述产生多孢子子囊的酵母，现有资料和观察不能得到一致的解释。

Winge, Roberts (1950, 1954) 获得的遗传学和细胞学的资料证明，酿酒酵母×薛瓦酵母 (*Sacch. chevalieri*) 杂种的某些子囊，在减数分裂后接着进行有丝分裂。此外，还证明酿酒酵母菌株含 5~8 个孢子的子囊，通常具有幼芽，这些子囊可能是由待出芽的双核细胞产生的，这些细胞停止增殖后，开始形成孢子。所以两个核在子囊中进行减数分裂，形成 8 个核 (Fowell, 1956)。援引的实验数据和观察提供了可靠的推测的依据，即在一个子囊内形成 4 个以上的孢子，可能是进一步有丝分裂或者是两个核减数分裂的结果。

所有产孢子酵母都是在单倍期完成孢子形成的过程，这个过程是获得杂种菌株的必需阶段，因为交配通常都是单倍体孢子或细胞的融合。但是，酵母的某些种、属完全不能形成孢子，或形成很少的孢子。此外，产孢子能力弱通常与孢子生命力低是相联系的。在这种情况下，很少形成四孢子子

囊，而这种子囊正是遗传学研究时进行四分体分析所必需的。因此，试图从产孢子能力弱的酵母来获得杂种是很困难的。

遗传学领域进行理论研究时，可以挑选繁殖力强、形成孢子多的菌株作为试验菌，这样就能克服上述困难，为工业生产（例如为面包、啤酒、酒精生产）提供优良性状的杂种，只能采用某些优良菌株作为杂交的原始菌株。但是，大多数生产用菌株，特别是啤酒酵母〔卡尔斯伯酵母(*Sacch. carlsbergensis*)〕只能形成很少孢子，而这些孢子的生命力又很低。

为了提高酵母形成孢子的能力，可从产孢子前的培养基到产孢培养基上进行反复移种 (Bedford, 1942)。用分离单细胞并从中挑选产孢能力最强的单细胞菌株的方法，可以得到良好的结果。这种方法对增加四孢子子囊特别有效 (Fowell, Moorse, 1960)。

众所周知，某些酵母在合成培养基上培养时，丧失其产孢能力，这可能是细胞群体产生突变的结果，新产生的突变体不能产生孢子，但其繁殖比产孢的原始菌株要快得多，以致原始菌在移植时就被淘汰。在 *Sacch. acidifiens* (*Zygosacch. mandshuricus*) (Olenov, 1936) 和粟酒裂殖酵母 (Leupold, 1950) 中都观察到这种现象。杂交对产孢子的能力有着极大影响，根据 Косиков、Бочаров (1965) 的资料，在64株面包酵母杂种中，有10株在醋酸盐培养基上能形成子囊的占50%以上（100个细胞形成的孢子数在150个以上）。

酵母不同种和菌株的孢子生命力有很大差异，实验证明，这是遗传变异起着主要作用。近亲交配和杂交对孢子的

生命力也是有影响的(Winge、Laustsen, 1939a, 1940)。杂种孢子的生命力可能比亲株强, 也可能比亲株弱得多。根据Косиков (1956B) 的资料, 酿酒酵母与粟酒裂殖酵母杂交得到的远缘杂种能形成孢子, 但其生命力完全丧失。但是经过三年以后, 孢子的生命力又部分地得到恢复(Косиков, 1961)。当非整倍性、三倍性、移位作用、致死突变和基因相互作用时, 能观察到酵母孢子生命力的降低(Mortimer、Hawthorne, 1966)。这种情况, 按推测主要是隐性致死突变体的相互作用所造成。而近亲交配法和选种法可以得到良好结果。对于酿酒酵母Rasse X 菌株, 用上述方法获得了成功。当七次连续选种并将整个子囊进行培养时, 孢子的生命力从0.7%提高到90%(Инге-Вечтомов, 1963)。

对孢子形成和孢子生命力进行遗传学检查的情况表明, 酵母产孢能力在很大程度上取决于培养条件和培养基成分, 这一点已为大量研究工作所证明。根据初步观察得出如下结论, 即细胞仅在营养物质耗竭时才产生孢子。但是, 后来的研究又进一步证明, 情况并非完全如此, 培养基内少量营养物质和某些成分的存在, 对孢子形成起着重要的作用。Hansen (1911a, b) 首先发现, 酵母产孢的条件除营养物质缺乏外, 还需要氧、水以及适当的温度; 细胞应当是幼龄的, 并培养在完全培养基中。Hansen 还证明, 酵母产孢温度是从3~37℃, 较其生长温度0.5~47℃的幅度为窄, 而最适宜的产孢温度为25~30℃。各种酵母在不同培养基上的产孢能力各异, 并非任何一种培养基都对所有酵母的种和菌株产孢都是最适合的。

为阐明酵母产孢前及其产孢时的代谢特征, 必须选择适

当的培养基将这两个阶段分开。C. C. Lindegren, G. Lindegren (1944) 认为, 对酿酒酵母菌株均选用有名的菜汁和果汁的混合物琼脂作为产孢前的培养基。Fowell、Moorse (1960) 认为, 产孢前培养基应含有丰富的葡萄糖和含氮化合物, 并加入酵母浸膏——其中含有B族维生素的全部组分, 以保证菌体生长良好。最好采用液体培养基, 这样就可以在以后产孢培养基上形成较多的子囊。当温度30℃时, 将酵母在产孢前的培养基上培养24~48小时, 并间歇地振荡培养物以除去多余的二氧化碳。在Косиков实验室, 采用7°Bx麦芽汁作为产孢前的培养基, 也得到了很好的结果。

长期以来, 广泛地采用石膏块 (Engel, 1872) 和格罗德可夫琼脂 (A. A. Городков, 1908) 作为产孢培养基。但是, 较详细地研究了影响形成孢子的各种因素 (主要是不同浓度的各种物质成分) 后认为, 采用合成培养基比较有效。目前, 醋酸钠培养基受到广泛地好评。各著者提出, 在各种组分的合成培养基中采用醋酸钠或醋酸钾 (Mc Clary等, 1959)。在此, 著者推荐华威尔培养基 (Fowell、Moorse, 1960; Fowell, 1967, 1969) 作为酵母培养全过程的培养基 (兼作产孢前和产孢培养基)。

1. 接种酵母于10毫升产孢前的液体培养基 (含5~10%葡萄糖) 中, 在30℃培养24~48小时 (间歇振荡培养物);

2. 将培养基中的酵母菌体离心分离, 用蒸馏水洗涤两次, 然后再悬浮于0.5毫升蒸馏水中;

3. 取上述悬浮液约0.01毫升; 接种于琼脂斜面上。该琼脂斜面培养基含有如下成分: 无水醋酸钠 0.5 克, 氯化钾 1 克, 琼脂 1.5 克, 蒸馏水 100 毫升;

4. 接种后, 将试管置于 25℃ 保温箱中, 培养 3~5 天。

Adams (1949) 等的研究表明, 接种细胞的密度, 对酵母孢子的产生有很大影响。酿酒酵母形成孢子时, 应保持一个适宜的细胞密度, 密度过大或过小, 形成孢子都较少。必须指出, 在醋酸盐琼脂培养基上, 其细胞群体的密度对孢子形成的影响, 要比其他培养基小得多, 但其密度也不应低于 0.5×10^6 个细胞/ml 琼脂培养基 (Fowell, 1967)。

有性过程

Kruis, Satava (1918), Satava (1918, 1934) 和 Winge (1935) 证实, 酿酒酵母的菌株, 通常是二倍体菌株。其生活史具有单倍期和二倍期交替的有性过程。当接种于产孢培养基上时, 便形成单倍体孢子的子囊。孢子在新鲜培养基上发芽, 再形成单倍体菌株, 或相互接合而成合子。由于合子发生核的融合, 因而恢复了二倍期。

许多研究者 (Winge, Laustsen, 1937, 1938; Winge, 1944; Winge, Roberts, 1948; 等等) 采用遗传学方法证明了酵母在产孢过程进行减数分裂, 还证明了菌落的形态特征、细胞大小、发酵力 (发酵各种碳水化合物) 都在基因控制之下。根据许多特征, 酵母属的多数种是属于异宗合子菌种, 在产孢时进行分裂。长期移植时, 单倍体菌株的交配活性明显地下降, 最后完全消失。这是交配型基因突变或者是基因-变更因子的变异所致 (C.C. Lindgren, G. Lindgren, 1943c)。但是, 有些单倍体菌株