

2

微生物育种学术讨论会文集

(国外资料评述)

微生物育种学术讨论会 编

科学出版社

微生物育种学术讨论会文集

(国外资料评述)

微生物育种学术讨论会 編

科学出版社

1974

内 容 提 要

本会议集选编国外有关微生物遗传育种、遗传性状的控制、杂交、转化、转导、突变的分子机理、抗菌素菌种选育评述及放线菌的变异研究的译文, 可供从事微生物遗传和育种工作的科技人员和高等院校师生参考。

微生物育种学术讨论会文集

(国外资料评述)

微生物育种学术讨论会 编

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1974 年 11 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16
1974 年 11 月第一次印刷 印张: 9
印数: 0001—5,910 字数: 208,000

统一书号: 13031·189
本社书号: 323·13-9

定 价: 0.95 元

选 编 说 明

在毛主席革命路线指引下,由中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办的“微生物育种学术讨论会”,于1973年5月7日至5月16日在安徽省芜湖市召开。参加会议的有来自全国廿二个省、市、自治区的八十四个生产、科研和教学单位的一百五十三名代表。代表中有来自生产第一线的工人同志,有领导干部,有科技人员和高等院校教师。

会议贯彻了理论与实践相联系和百花齐放、百家争鸣的方针,检阅和交流了已取得的成就和经验,介绍了国外育种工作的进展,讨论了进一步开展工作的意见。

为了促进更广泛地交流,现仅将会议上部分代表所作的有关微生物遗传育种、遗传性状的控制、杂交、转化、转导、突变的分子机理和抗菌素菌种选育进展近况等七篇评述,及一篇有关放线菌的变异研究的译文选编成集,以供读者参考。不妥之处,欢迎批评指正。

编 者

1973.6.

目 录

微生物遗传育种国外动态介绍	盛祖嘉(1)
关于微生物遗传性状控制的几个问题	沈善炯(24)
微生物的杂交及其应用	蔡金科(33)
遗传转化及其在育种中应用的前景.....	中国科学院遗传研究所 204 , 205 组(50)
关于细菌转导的理论及其应用研究进展	范云六、姜书勤、王清海(61)
突变的分子机理	庄增辉(78)
抗菌素菌种选育进展近况	刘颐屏(105)
附 录	
抗菌素及其它生理活性物质的产生菌——放线菌的变异研究···	江顺谦、王蓉贞译(131)

微生物遗传育种国外动态介绍

盛 祖 嘉

(复旦大学生物系, 上海)

育种工作的理论基础是遗传学。本文介绍近年来国外和育种有关的微生物遗传学方面的动态, 及其在微生物育种工作中的应用。为了理解现状展望未来, 本文还对于一些理论发展作适当的历史回顾。

一、基因突变和诱变育种

育种工作主要依靠诱变和杂交两种手段。杂交的目的是获得有利于生产的基因组合, 可见双亲的因子型有所不同, 杂交才能见效。因此基因突变是育种工作的原材料; 控制突变是遗传育种工作的一个重要课题。

(一) 突 变 的 控 制

现代基因突变的研究开始于 1909 年, 那时从红色复眼的果蝇中间发现了一只白色复眼的果蝇, 这一突变是自然发生的, 所以习惯上称为自发突变。自发突变的特点是: 每一突变影响生物的某一特定的形态或生理性状; 通过染色体分裂和细胞分裂突变基因能传给子代, 使子代发育成为突变型个体; 突变的出现是突然的, 就以红色复眼变为白色复眼为例, 红眼果蝇并不先产生粉红色复眼果蝇, 然后产生白色复眼果蝇, 而是直接由红色变为白色; 突变的出现时间、个体、所影响的性状等方面都不能预测; 突变的发生是很稀有的, 而且各个基因的突变往往各不相关。

以上这些特性不论是对于果蝇、玉米、人、细菌等等都是如此。由于这些特性, 使人感到似乎突变无法控制。

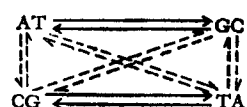
我们要控制一个事物, 就需要了解这一事物; 而对于一个事物的了解又往往是从对它的控制开始。1927 年有人用 X 射线在果蝇和玉米中引起突变, 这是控制突变的开始。不过就以上这些特性来讲, 只不过是改变了基因突变的总的频率, 但是并没有涉及改变哪一个个体或哪一个基因的突变等问题。

在微生物中很多人注意到在接触药物以后就会出现耐药性的微生物。那么是不是药物引起了抗药性变异呢? 如果确是这样的话, 这至少是一个引起特定突变的例子。可是在 1943 年就有人间接地证明细菌群体在接触噬菌体以前已经发生了抗噬菌体突变; 1952 年又有人提出了直接的证据, 说明细菌在接触链霉素以前就发生了抗链霉素突变。这些实验不应该理解为说明突变无法控制, 而应该理解为说明突变的控制不应该从基因的生理效应这一角度去研究, 而是应该从基因的结构和突变的过程方面去研究。

1946年发现了某些化学药品能够引起突变。接着在1949年又发现了光复活作用,那就是可见光对于紫外线的杀菌和诱变的恢复作用。这给人们新的启示,既然突变是可以恢复的,那么突变的出现必然经历一个过程,只要详尽地研究这一过程,突变便能被控制。微生物遗传学的方法为这方面的研究提供了方便。在50年代中出现了许多关于不同化学药品或射线对于不同基因专一性的诱变效应的报道。例如有人用处在链孢霉孢子的同一细胞核里面的两个营养缺陷突变基因作为材料,测定许多种化学药品对于它们的诱变效应,以避免遗传型背景的影响,结果发现诱变效应相差可达几千倍(表1)。在控制基因突变方面虽然又前进了一步,可是只有在认识了遗传物质的结构以后才能对于这些经验数据提供合理的解释。

表1 两种诱变剂对于链孢霉中两个营养缺陷型的回复突变的诱变效果的比较 [1a]

诱 变 剂	每 10^6 孢子中的回复突变数		比 值
	肌 醇 缺 陷 型	腺 嘌 呤 缺 陷 型	
甲基磺酸乙酯	11.8	17.4	1.5
甲基磺酸溴乙酯	0.04	152.0	3800.0



$\longleftrightarrow$ 转换
 $\longleftrightarrow$ 颠换

在1953年所提出的DNA分子结构理论的推动下,诱变机制的研究出现了一个飞跃。在1959年有人提出了系统的诱变机制理论,认为突变主要是一对碱基的改变,其中尤以转换为主。

通过试管中化学反应的测定可以看到不同的诱变剂和不同的碱基能起一定的化学反应。通过这些化学反应以及随着发生的DNA复制便带来了碱基对的变化。由于各种化学药品对于各种碱基的作用不同,所以引起转换的方向也不相同。例如羟胺几乎只和胞嘧啶发生化学反应,所以几乎只引起 $G \rightarrow A$ 转换,甲基磺酸乙酯(EMS)等则较多地引起 $G \rightarrow A$ 转换,但是多数诱变剂如2-氨基嘌呤(2AP)、5-溴尿嘧啶(5BU)、亚硝酸等则既引起 $G \rightarrow A$ 转换,又引起 $A \rightarrow G$ 转换。此外还有一类诱变剂如吖啶黄等专门引起插入或缺失一对碱基而造成移码突变。

这一理论为上面所举不同药品诱发回复突变的频率相差可达几千倍这一事实提供了一种解释。可是从控制突变这一角度来看,发现了回复突变诱变的专一性并不意味着在育种工作中我们已经能够控制突变。这是因为回复突变常是某一对碱基的改变的结果。在诱变育种工作中我们要求诱发正向突变,而一个基因可能包含上千对碱基,不同的基因中都含有千百对 A 或 G , 所以只和其中任何一个碱基发生化学反应的药品仍然能引起任何一个基因发生突变。当然某一对碱基的是否容易为一诱变剂所作用,除了主要决定于本身的成分以外,还受附近的碱基的影响,所以如果测定同一基因的许多不同位点的突变往往可以发现对于某一诱变剂来讲,特别容易引起某一些位点的变化(这些位点因此被称为热点)。但是各个基因都有热点,所以就各个基因而不是就位点来讲,诱变作用的专一性

似乎应该不那么显著。

不过正向突变的专一性现象也常有报道。较为突出的情况,例如,在一种链球菌中曾经报道一定剂量的紫外线所诱发的四种抗性突变(抗链霉素、抗氨基嘌呤、抗噬菌体和抗四环素)的突变率相差最大的可达 2000 倍;同步培养实验结果说明这些似乎确是单个基因突变^[1b]。已经知道紫外线的诱变作用主要通过它促使 DNA 单链上邻接的胸腺嘧啶结合成为二聚体而实现。但是很难想象一个基因中相邻接的胸腺嘧啶的含量会大于另一基因 2000 倍,这说明对于专一性的诱变效应问题还有待于深入研究。

基因突变离不开 DNA 复制,所以除了从诱变剂的角度去控制突变外,按理也可以通过控制 DNA 的复制而控制突变。已经知道蛋白质的合成对于 DNA 复制是必要的。把一个正常生长中的多重氨基酸缺陷大肠杆菌培养物中的氨基酸除去以后在一、二小时内 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基(NTG)对于各个基因的回复突变的诱变效应便逐渐下降。在加入所需要的全部氨基酸以后,各个基因回复突变的诱变效应又逐渐上升,它们上升的先后次序为 arg-str-pro。在另一同步培养试验中诱变高峰的出现的先后次序为 arg-str-azi-pro-lys-his-try。这些次序和各个基因在染色体上的排列次序相符。这被解释为 DNA 复制从染色体的某一位置开始顺序前进,而 NTG 的诱变作用则对于正在进行复制的部位最为有效^[2]。

DNA 复制部位的构形特点可能是双链解开,而在 DNA 进行转录时可能也具有这一特点。曾经有人比较 β -半乳糖苷酶结构基因 Z 在经诱导或不经诱导时对于 NTG、EMS 和硫酸二乙酯(DES)三种诱变剂的反应,结果发现经诱导以后的基因的诱变效应高出不经诱导时 6—8 倍,用 X 射线、5 BU、2 AP 等作为诱变剂时则没有区别^[3],说明诱变剂的特点和 DNA 复制时的构形特点都能影响基因突变。

有许多事实说明大肠杆菌的染色体和细胞膜有联系。有人曾用易为细胞色素所吸收的 320—400 毫微米光线处理相对湿度为 60% 时的大肠杆菌 HfrH 菌株,经 4 °C 处理后进行同步培养的细菌,在不同时间处理时所出现的营养缺陷型的类型各不相同(表 2)。

表 2 半干燥状态中的大肠杆菌 HfrH 经不同时间的同步培养后再用 320—400 毫微米光线处理后所得到的营养缺陷型的种类^[4]

同步培养时间	出现的营养缺陷型(括号中的数字系根据其他文献资料所查得。用杂交时基因转移时间所表示的各基因在染色体上的位置)
15'	his(89')
30'	met(59—78'), ser(57—89', 个别基因位置在 18' 左右), cys(58—72', 个别基因位置在 25')
60'	lac(10'), pro(7—10')

每一时间所出现的各种缺陷型的位置都相接近这一事实,同样说明突变的诱发在一定时间集中在 DNA 的某一位置,这位置可能就是 DNA 正在复制中的位置。似乎半干燥状态中的细胞色素把所吸收的光能传达给 DNA 而引起突变,而且可能在 DNA 复制过程中各个部位依次和细胞膜相接触,从而依次诱发各个部位的基因发生突变。此外,不同菌株在同一同步培养时间,在相同处理中出现的缺陷型在每一菌株中也大多只属一种,这方面的工作虽然还不很多,却为控制突变指出了新的方向,特别是 320—400 毫微米光线处

理中所观察的是正向突变,所以可能具有一定的实践意义。

当研究工作集中在诱变剂对于碱基的化学反应的同时,也有人注意到诱变反应的差别性并不完全由碱基和诱变剂的化学反应以及 DNA 复制所决定,而和其他生理特性有关。

首先,一种诱变剂要发生诱变作用必须进入细胞,因此细胞的透性和诱变反应有关。其次,诱变剂进入细胞在接触 DNA 之前可能为细胞所破坏。这些因素都可能导致不同生物的诱变反应的差别性。在诱变剂和 DNA 发生化学反应以后, DNA 的某些结构变化可能被细胞的某些机能所修复,某些结构变化可能进一步引起其他变化。近年来发现这些都和基因突变有关,而且也 and 细胞中的一系列酶的作用有关。

基因突变过程中的酶的作用从紫外线诱变作用中的光复活酶的发现开始。60年代初有人发现紫外线的作用主要(90%)影响 DNA 的一条单链,而且主要是使两个邻接的嘧啶结合成为二聚体,其中尤以胸腺嘧啶二聚体为主。二聚体的形成使 DNA 不再能进行正常的复制而死亡。可见光的作用在于使二聚体分解而使 DNA 恢复原状,在这个反应中有光复活酶参与作用。接着又发现在黑暗中细菌也具有恢复 DNA 损伤的机能,而这些机能又和另外一系列酶有关,而且接着又发现这些修复机能又和突变有关。

在修复作用和突变的关系的研究中常应用修复作用的某一环节发生了遗传性障碍的突变型,主要是紫外线敏感(uvr^-),寄主细胞复活缺陷(hcr^-),切补缺陷(exr^-),重组缺陷(rec^-),光复活缺陷(phr^-),增变因子(mut)等。应该指出,这些特性常不是彼此排斥而恰是相互有关的,它们无非表示从事研究工作的人最初所着眼的特性。

DNA 的暗修复一般认为可以分为复制前修复和复制后修复;复制后修复也就是重组修复。复制前修复方面了解较多的是先切后补,不过也可能还有另一种先补后切机制。这些修复过程中至少有四类酶参与作用,即内切核酸酶(endonuclease)、外切核酸酶(exonuclease)、DNA 多聚酶(DNA polymerase)和连接酶(ligase)。三种修复过程见图 1,图中黑点表示胸腺嘧啶二聚体,在先切后补作用中带有二聚体的小段 DNA 单链在内切核酸酶和外切核酸酶作用下被切除,然后在 DNA 多聚酶的作用下以相对单链为模版而复制,最后在连接酶的作用下连接为完整的双链。在先补后切作用中可能涉及相同的几种酶,但作用的次序则不相同。在重组修复作用中二聚体不被切除,在复制时和二聚体相对的位置上留出空隙,然后以某种方式进行交换而形成一个完整的双链。

比较 phr^- 和 phr^+ 菌株的诱变反应的结果说明,由光复活酶促成的反应(即使胸腺嘧啶二聚体分解为胸腺嘧啶)固然可能引起突变,但是没有被分解的二聚体的存在更能引起突变,也就是说多数突变发生在切补或重组修复过程中。

在大肠杆菌 T4 中基因 43 是 DNA 多聚酶结构基因。曾经发现在一部分基因 43 突变型中 rII 突变基因的自发回复频率比基因 43 没有发生突变的噬菌体中高出一千倍以上,也有一些基因 43 突变型则相反地使自发突变率下降。将前一噬菌体感染大肠杆菌,然后将 T4 多聚酶提纯并进行离体实验,即把多聚脱氧核苷酸作为模版,测定在 T4 DNA 多聚酶作用下进行 DNA 离体复制时参入的核苷酸种类。发现在突变型多聚酶作用的情况下胸腺嘧啶取代正常的鸟嘌呤,多于正常多聚酶作用情况下 4 倍。作用体系中用锰离子代替镁离子时则多出 5—20 倍^[5],这一事实正好可以和氯化锰本身具有诱变作用这一事实相印证。此外在大肠杆菌中也曾经发现 DNA 多聚酶突变型菌株中可积聚更多的营养缺

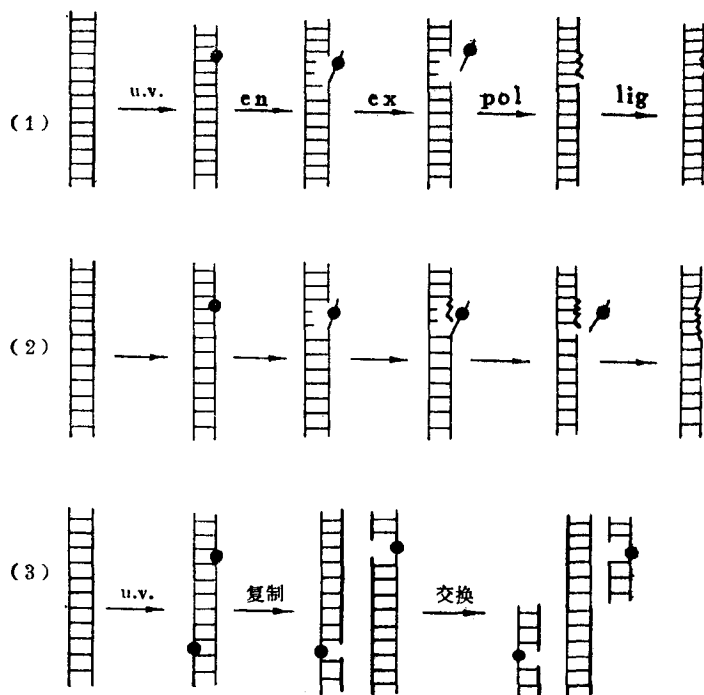


图 1 三种 DNA 修复作用示意图

(1) 先切后补 (2) 先补后切 (3) 重组修复

u.v.=紫外线处理 en=内切核酸酶 ex=外切核酸酶 pol=DNA 多聚酶 lig=连接酶

陷型^[6]。这些事例都说明切补过程可以导致突变。

可是更多的突变可能发生在胸腺嘧啶二聚体没有切除的情况下，因为在大肠杆菌中曾发现在切补作用发生缺陷的突变型 hcr^- 中紫外线可以诱发更多的突变，而且对二聚体切除具有抑制作用的药物如咖啡碱可以使紫外线诱发突变增加。另一方面利用重组缺陷型 rec^- 进行研究，证实在这类缺陷型中较不易诱发突变，可见上面所讲在 hcr^- 菌株中可以诱发更多突变正是由于重组修复机能的存在。在酵母菌中曾经发现在减数分裂过程中比有丝分裂过程中容易发生突变^[7]。更有说服力的是大肠杆菌的原黄素诱变研究工作结果^[8]。在利用两侧基因作为标记的情况下比较抗阿拉伯糖突变时，在进行杂交可是抗性基因部分不发生重组的情况下，突变频率比不经原黄素处理时没有提高，可是在发生重组的情况下则提高达 100 倍。所得到的突变型经过进一步分析，证明都属移码（即插入或缺失）类型。这一实验一方面说明细胞结合状态和突变无关而重组才是导致突变的因素；另一方面又说明重组之所以能导致突变，可能是由于不相等交换的结果。

总起来讲，可以看到诱发突变不只决定在 DNA 和诱变剂的化学反应，而是很大程度上决定在反应以后的代谢过程。诱发突变的频率也不只取决于诱变剂的诱变效能，而在一定程度上决定于细胞的遗传型。一个突出的例子是在枯草杆菌中发现某一个甲基磺酸甲酯(MMS)敏感菌株的某些缺陷标记不能为称作超诱变剂的 NTG 所诱发回复^[9]。这一点在诱变育种工作中或许也有实践意义，因为往往碰到这样的情况，一个菌株经一再诱变以后可能变得对于某些诱变剂反应迟钝。最后，基因突变的控制也决不限于诱变剂的选

择,而是包括 DNA 复制过程的控制以及一系列酶的活动控制,酶的活动则可以通过遗传型的改变或是外界条件加以控制。

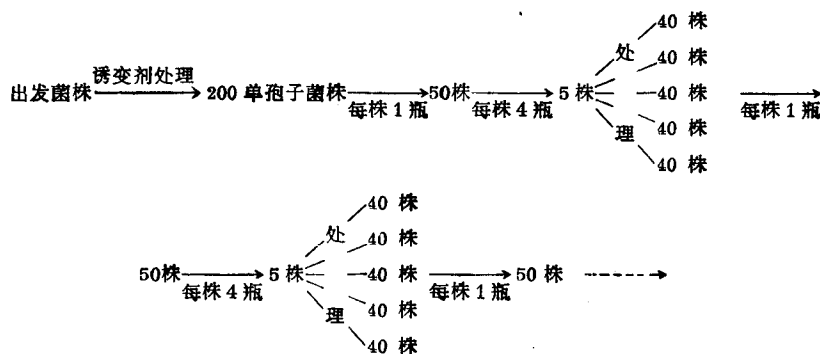
从以上的历史回顾和现状来看,对于突变机理的认识和对于突变的控制已经有很大的进展,可是对照开始时所提出的自发突变的特性来看,离开完全控制基因突变还有很大的距离。

(二) 诱 变 育 种

从诱变育种角度考虑问题,可以看到诱变剂的处理只是整个工作中的一个环节。一个有效的诱变育种工作必须全面考虑各个环节。下面分工作部署、提高筛选效率两个方面介绍一些事例。介绍不求全面,希望从中可以得到启发,达到举一反三的目的。

1. 工作部署 在诱变育种工作中诱变剂的处理可以比喻为战役或战术问题,工作部署则是一个战略问题。由于经任何诱变剂处理以后提高产量的突变菌株仍属少数,而且一般产量提高不多,所以必须测定大量经处理的单孢子菌株才能选得高产菌株。另一方面由于产量测定工作误差较大,所以必须较多重复才能选出产量最高的菌株。这样,在所要测定的菌株数和准确性的要求之间就存在着矛盾。要解决这一矛盾,一般都采用初筛,复筛二个阶段这一办法。对于初筛中采用多选菌落单瓶测定呢还是采用少选菌落重复二瓶测定方法这一问题曾有人进行计算^[10],认为以前者较为有效。

一般经初筛,复筛后选出产量最高的一个菌株作为进一步诱变育种的出发菌株。近来有人指出这一工作部署有一个缺点,那就是产量最高的菌株不一定是继续提高潜力最大的菌株。根据这一理由提出另一工作部署方案^[11]:



2. 提高筛选效率

(1) 培养皿上进行初筛: 在柠檬酸生产菌黑曲霉(*Aspergillus niger*)的诱变育种工作中有人采用微量滴管接种纸片培养方法,在培养液中加入酸碱指示剂溴甲酚绿,根据菌落直径和指示剂变色圈的直径的比值进行初筛^[12]。在蛋白酶生产菌(*Asp. sojae*)中有人根据酪蛋白固体培养基上菌落直径和透明圈直径的比值进行初筛^[13]。在头孢霉生产菌(*Cephalosporium* sp.)中有人根据菌落直径和抑菌圈直径的比值进行初筛^[14]。在这些工作中比值大小都和摇瓶产量相一致,因此都可以大大地提高初筛效率。

在金霉菌(*Streptomyces viridifaciens*)中曾经比较三种情况下的菌株摇瓶产量分布,这三种情况是不经处理菌落随机取样,紫外线处理后菌落随机取样和紫外线处理后利用

指示菌选取具有显著抑菌作用的菌落。从三种情况下的产量分布(图2)看来,利用指示菌进行初筛的效果是显著的,特别是NV和UV两图所根据的是大约各100个菌落的测定结果,而OM一图则只根据49个菌落的测定结果,所以实际效果应比图中所表示的更好。

(2) 改变培养基成份:在青霉素生产菌的选育工作中长期以来都在含有前体苯乙酰胺的发酵液中进行筛选。青霉素G的合成包括6-氨基青霉素酸(6APA)基本结构的合成和前体的连接。长期在含有前体的发酵液中筛选高产菌株的结果,使提高前一能力的变异得到充分发挥,可是对于前一能力则未必得到充分发挥。在改变培养基成分,即在不含前体的发酵液中进行选育时,便能使产量继续提高。下面这图(图3)表示经一再在含前

体的发酵液中筛选得到的高产菌株的孢子用乙烯亚胺处理后得到的单孢子菌株,分别在含有或不含有前体的发酵液中所测得的青霉素产量分布情况。从图可以看到在这种情况下用不加前体的培养基进行产量测定时有利于获得高产菌株。

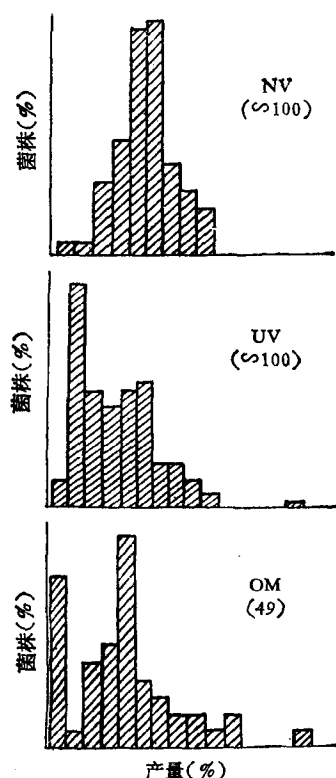


图2 金霉素生产菌的摇瓶发酵产量分布^[16]
NV=不经处理,菌落随机取样
UV=孢子经紫外线处理,菌落随机取样
OM=孢子经紫外线处理,菌落根据抑菌圈大小选取,括号中的数字表示取样菌落数

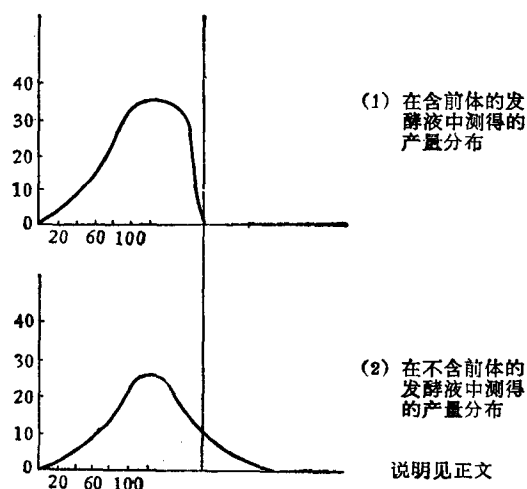


图8 青霉素产量分布^[10]

(3) 应用抗药性筛选高产菌株:在嗜石油棒状杆菌(*Corynebacterium hydrocarbonclastus*)中曾发现一部分青霉素耐药菌株的呼吸强度比敏感出发菌株为强,养料的消耗率较大,谷氨酸产量(在培养液中加入青霉素时)提高了3—4倍^[16]。由于筛选青霉素耐药性菌株简便易行,所以这比直接筛选高产菌株更为方便。其中的原理可能涉及代谢调节或细胞透性的改变。

通过代谢产物抗性菌株的筛选的育种原理和应用将在代谢调节部分讨论;其他耐药性或依赖型菌株在提高产量中的应用可能都属于代谢调节原理的应用,都将在代谢调

节部分讨论。

根据物理性能的筛选 在发酵工业生产中大量泡沫的产生带来许多不利因素，所以少泡沫突变型的筛选有它的实践意义。曾经发现多泡沫的酒精酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 容易吸附在泡沫表面。根据这一特性，只要使空气泡把多泡沫的酵母带走，就可以筛选得到少泡沫突变型^[17]。

不可能想象空气能够诱发突变，所以这些少泡沫突变型必然来自自发突变，也说明筛选所起的作用。

恒化器的应用 恒化器是保持培养条件长期不变的连续培养装置。酵母菌 (*S. cerevisiae*) 能利用它的酸性磷酸酯酶分解 β -甘油磷酸盐而生长。在恒化器中加入限量的 β -甘油磷酸盐，将 pH 调节到 6 (这时酶活性为最适 pH 的 70%)，经过长期培养，能自动地选出对于 β -甘油磷酸盐的利用率提高 30%，而且酶的最适 pH 发生改变以适应于恒化器中的酸碱度的突变菌株^[18]。

各种特殊突变类型的筛选方法可参看《微生物学方法 3 A》一书。

二、基因重组和杂交育种

不产生有性孢子的微生物的杂交首先于 1946 年在大肠杆菌中发现，在这之前 2 年已经发现了细菌的转化现象。1951 年又在细菌中发现了转导现象。随着细菌杂交机理的深入研究，接着发现了细菌中的 F 因子以及 F 因子转导。

细菌杂交之所以能被发现是因为利用了营养缺陷型作为标记。这一方法的应用使得有可能在细菌以外的许多其他微生物中发现杂交现象，其中包括真菌、链霉菌、红酵母、假丝酵母、小单孢菌、诺卡氏菌等等。

从杂交机理来看，虽然核心问题都是基因重组，可是导致基因重组的具体过程却不相同，其中研究得较为详尽的是大肠杆菌的杂交和真菌的准性生殖，近年来则又发现了附加体重组。

下面将就准性生殖、细菌的杂交不孕性问题以及附加体重组三个方面介绍基因重组的研究以及它们在杂交育种中的应用。

(一) 准性生殖和杂交育种

在细菌中发现杂交以后不久就于 1952 年在构巢曲霉中报道了准性生殖。所谓准性生殖是指真菌中不通过有性生殖的基因重组过程。不论有性生殖或准性生殖都包括单倍体和双倍体的转变，但是它们有显然的区别(表 3)。

在减数分裂过程中，每一对染色体发生交换并减为半数；在体细胞分离过程中，染色体交换和减半往往并不伴同发生。亲代隐性基因在子代中的出现称为分离；在准性生殖中体细胞交换和染色体减半都导致分离，可是它们分离发生在形态相同的细胞中，所以称为体细胞分离。

由于表 3 1, 2 两个特点，所以在通过准性生殖的杂交育种工作中必须利用营养缺陷型，否则就无从检出经结合而形成的双倍体细胞。由于 3, 4 两个特点，往往通过某些处理

表 3 有性生殖和准性生殖的比较

有 性 生 殖	准 性 生 殖
1. 进行结合的单倍体细胞和其他细胞形态显然不同	形态并不显然不同
2. 结合以后的双倍体细胞形态和单倍体细胞显然不同	形态并不显然不同
3. 由双倍体转变为单倍体细胞通过正常的减数分裂	通过各种体细胞分离过程, 这些过程都是偶然发生的
4. 以上过程是正常生活史中的各个阶段	偶然发生

才能获得结合起来的双倍体细胞以及由杂合双倍体细胞得来的分离子。

促使异核体中出现双倍体核的有效方法有樟脑蒸汽处理和紫外线处理等, 前者曾用来处理曲霉菌的异核体菌丝而得到双倍体孢子, 其数量超出未经处理者 10—1000 倍, 后者曾用来处理米曲霉异核体的多核孢子而得双倍体菌落, 其数量高出未处理者 10^5 倍。

促使双倍体细胞分离的方法很多, 其中有些适用于处理菌落, 例如甲醛和对氟苯丙氨酸等, 有些适用于处理双倍体分生孢子, 例如氮芥、二环氧丁烷、紫外线等。由于一些药品如对氟苯丙氨酸和甲醛等能引起体细胞分离, 可是不具或几乎不具诱变作用, 因此有人建议称这类药品为重组剂。由此可见一般在杂交育种过程中处理双倍体的孢子可以比处理单倍体孢子出现更大的产量变异幅度, 其原因更可能主要是由于基因重组而不是由于诱发更多的突变。

体细胞分离的机理在构巢曲霉中有比较深入的研究。杂合双倍体的菌落上常出现扇形部分, 这些扇形部分接种到新的培养基上时又常会再度出现扇形部分, 直到最后得到稳定的双倍体或单倍体分离子。这过程被解释为如图 4 所示情况。

杂合双倍体经重组剂处理后常出现更多分离现象; 射线的处理可能首先引起染色体断裂, 然后进一步导致分离, 其中还可能包括体细胞交换(图 5)。

杂交对于微生物育种所起的作用主要是导致多倍体的出现和导致有利基因组合的出现。多倍体育种曾在米曲霉中^[21], 稳定的双倍体曾在青霉菌^[22]中报道。关于有利基因的组合方面同样在米曲霉^[21]和青霉菌^[23]中报道。发酵产物产量的遗传一般是多基因的, 所以育种过程一般包括双倍体的获得, 双倍体孢子的处理以及测定存活单孢子菌株的产量, 后一部份工作和诱变育种工作没有不同。另一方面, 鉴于通过紫外线处理曾经在青霉菌中获得专一性地利用前体羟基苯乙酸的菌株, 以及在金霉菌中获得产生去 6-甲基四环素的菌株, 所以完全有可能通过准性生殖有预见地育成具有某些生产性能的菌株。

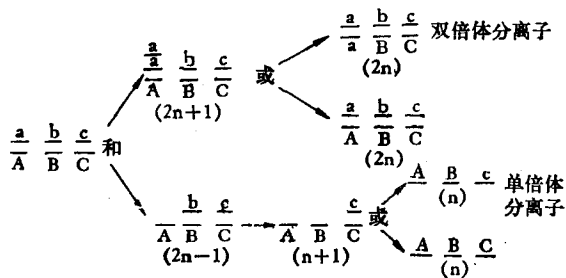


图 4 构巢曲霉杂合双倍体通过染色体分裂后趋向一极这一不正常行为而导致双倍体或单倍体分离子的出现的过程^[19]

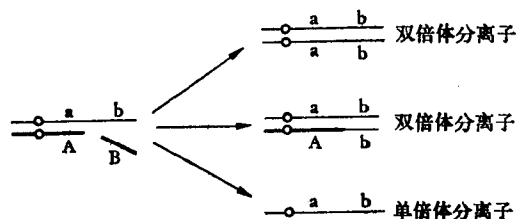


图 5 构巢曲霉杂合双倍体经射线处理后出现双倍体和单倍体分离子的过程^[20]

在有性生殖中, 异源染色体的汇合使减数分裂不能正常进行, 因而种间杂交常有困难。准性重组不通过减数分裂, 所以种间杂交较少障碍。

(二) 细菌的杂交不孕性的克服

在大肠杆菌杂交现象发现以后不久就发现了大肠杆菌 K-12 有几个类型。首先可以区别 F^+ 和 F^- , F^+ 能和 F^- 或 F^+ 杂交, F^- 只能和 F^+ 杂交。 F^- 细胞中没有 F 因子, F^+ 细胞中有 F 因子。 F 因子在细胞中有两种存在状态, 游离状态和插入染色体状态, 前一状态的细菌是 F^+ , 后一状态的细菌称为 Hfr, 即高度可育菌株。通过影印培养方法可以从 F^+ 群体中选出 Hfr 细菌, 这一事实被解释为 F^+ 和 F^- 菌株进行杂交时实际上只是其中极少数 Hfr 细菌和 F^- 细菌发生了杂交行为。 F^+ 转变为 Hfr 状态只发生在个别细菌中, 它的行为类似于基因突变, 可能包括染色体 DNA 和 F 因子 DNA 的交换。

应用中断杂交方法在大肠杆菌中证实了以下几点: ①Hfr 细菌的染色体以 F 因子附着的相反的一端开始进入 F^- 细胞中去; ②各个不同的 Hfr 菌株的 F 因子附着点不同, 所以进入 F^- 细胞中去的基因的次序也不同, 应用不同的 Hfr 菌株证实了大肠杆菌的染色体是环状的; ③用 Hfr 菌株作为供体, 杂交进行一定时间后使它中断, 然后测定有那些 Hfr 基因已进入受体细菌, 这样就可以绘制出用时间作为图距单位的染色体图。目前大肠杆菌的染色体图包括 310 个基因, 全部转移的时间在标准情况下是 90 分钟。在染色体图的绘制中还广泛地应用了转导和染色体缺失定位方法。

F 因子可以通过接触感染而使 F^- 细菌转变为 F^+ 细菌; F 因子的转移并且不限于同一种细菌, 沙门氏菌原来不能杂交, 但是一旦感染了大肠杆菌的 F 因子以后, 便能进行杂交。这是克服杂交不育的一个方法。

在 60 年代以前普遍地认为杂交是否成功决定在 F 因子, 可是 1962 年有人发现杂交是否成功并不完全决定于 F 因子。在噬菌体中早已发现寄主细胞接受某种噬菌体的感染的程度往往决定于这些噬菌体是否曾在这些寄主细胞中繁殖, 这一现象的深入研究证实了噬菌体 DNA 进入寄主细胞以后往往受到寄主细胞的酶的作用。例如甲基化酶, 它使噬菌体 DNA 某些特定位置上的腺嘌呤和胞嘧啶转变为 6-甲基腺嘌呤和 5-甲基胞嘧啶; 另一种核酸酶, 也称为限制酶, 它促使没有甲基化的 DNA 的分解。这两种酶对于 DNA 的同一位置竞相作用作用的底物, 所以噬菌体 DNA 进入寄主细菌以后或是被甲基化或是被分解, 两者必居其一, 两者又互相排斥。每一种噬菌体有接受某一寄主细菌的酶作用的若干位置, 又有接受其他细菌的酶作用的其他位置。每一种细菌的酶只作用于噬菌体 DNA 的某些特定位置上的腺嘌呤和胞嘧啶。当某一细菌群体接触来自另一菌株的噬菌体时, 大部分噬菌体的 DNA 由于还没有甲基化, 所以都被分解了; 少数 DNA 则在没有被分解前被甲基化了, 包含着这些 DNA 的噬菌体再去感染同一寄主时它的 DNA 就不被分解, 也就是说它在这一寄主细菌中的繁殖已不受限制。接着又证实细菌杂交的是否成功也往往决定在受体细菌对供体 DNA 的分解或限制作用, 同一限制作用也决定 F 因子的感染能否成功。甲基化作用和限制作用都是细菌的酶作用的结果, 所以可以得到失去甲基化作用和限制作用的细菌, 将失去限制作用或没有限制作用的细菌作为杂交的受体往往就能克服杂交不育。

Citrobacter freundii 和大肠杆菌同属一科但属于不同的属, 它很不容易感染大肠杆菌的 F 因子 ($<3 \times 10^{-8}$)。如果将少数接受了 F 因子的细菌用吡啶黄除去 F 因子, 然后再进行 F 因子感染试验时, 就可以得到感染率为 1.8×10^{-4} 的非限制菌株 (r^-), 它们由野生型 (r^+) 经突变得来。用 r^- 菌株和原来的 r^+ 菌株作为受体, 测定供体菌株时, 可以区别两类供体, 即失去甲基化作用的 (m^-) 和没有失去甲基化作用的 (m^+) 菌株^[24]。

		受	体
		r^+	r^-
供体 {	m^+	1.4×10^{-2}	5.0×10^{-3}
	m^-	1.5×10^{-5}	2.5×10^{-3}

以上数据说明 F 因子在受体 m^+ 中已经被甲基化, 因此不论在 r^+ 或 r^- 细胞中都不被限制; F 因子在 m^- 菌株中不被甲基化, 所以进入 r^+ 细胞中受到限制, 而进入 r^- 细胞则不受限制。

诱变剂如 NTG 等可以促进 r^- 和 m^- 细菌的出现。

C. freundii 和大肠杆菌和沙门氏菌杂交时都很难得到重组体, 但是用前者的 r^- 突变型作为受体进行杂交时便容易得到杂交子代。

利用非限制性的受体, 曾经使大肠杆菌从肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 获得固氮能力^[25]。已经知道后者的固氮基因 (*nif*) 和组氨酸基因紧密连锁, 所以把野生型的肺炎克氏杆菌和没有限制作用的大肠杆菌 (*E. coli*) C 的组氨酸缺陷、抗链霉素菌株进行杂交, 在含链霉素而不含组氨酸的培养基上选择不需要组氨酸而抗链霉素的杂交子代菌落。这些菌株除了能固定分子氮以外其他特征都同大肠杆菌, 而且还得到传代过程中固氮性能不改变的稳定菌株。这一例子也说明基因连锁知识的具体应用。杂交育种在细菌中还少应用, 但从上述例子看来还是有着很大的潜力。

(三) 附加体重组

转导的原来的意义是通过温和噬菌体的感染而将一个寄主细胞的基因转移给另一寄主细胞, 从而导致基因的重组。以后发现可以起基因转移作用的因子并不限于温和噬菌体, 而包括和细菌杂交有关的 F 因子、和产生某种毒素有关的大肠杆菌素因子 (Col) 以及和细菌的抗药性有关的抗药性因子 (R) 等。

由于这类因子的一些共同的特性, 它们一般统称为附加体 (episome); 它们可以游离或插入染色体两种状态存在于细胞中。它们都是 DNA 的短片, 其中 F 因子已证明为环状。和细菌的基因一样, 它们本身决定细菌的某些生理或形态性状。例如 F 因子决定细菌表面毛状物的形成, 从而决定细菌的“性别”以及能否为性别专一性的噬菌体所感染; 大肠杆菌素因子决定细菌产生大肠杆菌素的能力, R 因子决定细菌的耐药性等等。除此以外它们都能通过细胞的接触而感染转移; 它们往往相互排斥; 往往能通过吡啶黄等药物的处理而消失; 此外它们又常能把“寄主”细胞的一些染色体基因转移给别的细菌。

能够转移特定基因如乳糖发酵基因的 F 因子 (F-lac) 可以用下列方法选得: 将已经知道 F 因子在染色体上位置在 *lac* 旁边的 Hfr 2 细菌和抗链霉素的乳糖不发酵 F⁻ 细菌混合, 30 分钟后加入链霉素将 Hfr 细菌杀死, 然后将 F⁻ 细菌涂布在含有乳糖的伊红美蓝 (EMB)

培养基表面,长出来的深红色菌落一般就是带有 F^-lac 因子或 F' 因子的 F^- 细菌的菌落。这是因为 lac 基因是 Hfr 2 染色体上的最后一个基因,它一般在混合 2 小时左右才会在 F^- 细胞中出现。过早地出现于 F^- 细菌中这一事实说明 lac 基因已和染色体相脱离,而作为和 F 因子相连接的一个部分,由 F 因子带着进入到 F^- 细胞中去。上面这一解释得到许多方面的证实,主要是因为这些细菌又会使另外的 $F^- lac^-$ 转变为 $F^+ lac^+$ 细胞,而且 F 因子的转移和乳糖发酵性状的转移必定相伴发生而和其它染色体基因的转移无关^[26]。

从游离的 F^-lac 菌株可以得到 F 因子又插入染色体的菌株。方法是首先筛选 F^-lac 因子发生突变而成为温度敏感的 $F_{TS}lac$ 因子的菌株。这种带有 $F_{TS}lac$ 因子的细菌在 $30^\circ C$ 中培养能保持 $F_{TS}lac$,但是在 $42^\circ C$ 中培养时由于 $F_{TS}lac$ 不能复制而消失。如果 $F_{TS}lac$ 插入染色体中,那么它就作为染色体的一个部分而和整个染色体同时复制因而得以保存。所以在 $42^\circ C$ 中混合 $F^+ F_{TS}lac$ 和 $F^- lac^-$ 细菌,在培养皿上选取乳糖发酵菌落,便可以得到 F^- 染色体上带有插入的 $F_{TS}lac$ 因子的细菌。一般插入的位置都在 F^- 染色体的原有 lac 座位旁边,这看来是因为两者本是同源的缘故。

也可以使 lac 基因插入染色体的其他指定位置。所根据的原理是这样的:一个基因必须保持完整才能发挥正常作用,如果一个基因中间插入另一个基因,就会使前者失活,正象发生了突变一样。首先必须使 F^- 染色体的 lac 基因发生缺失,以保证插入的 lac 基因不会插入 lac 座位旁边。具体地讲如果要使 lac 基因插入在 Tl 基因中间,那么只要把 $F^+ F_{TS}lac$ 细菌和 $F^- \Delta lac$ 细菌在 $42^\circ C$ 中相混合,涂在培养基上,加上噬菌体 Tl ,选出抗噬菌体 Tl 的乳糖发酵菌落就行了。这些细菌一般都是 F^- 细菌的染色体中插入 $F_{TS}lac$ 的结果,而且其插入位置必然在 Tl 基因中^[27a],这是因为如果说抗性的出现是由于 Tl 基因发生突变的结果,那么乳糖发酵特性的出现(这是 $F_{TS}lac$ 插入的结果)和抗性的出现无关,这两个特性同时出现在一个菌落中的机会就将是十分难得了。

在大肠杆菌中有一些温和噬菌体只能进行局限性的转导,这是由于它们插入寄主染色体的一定位置的缘故。由于 F 因子能将指定的基因插入染色体的指定位置,所以可将指定基因插入温和噬菌体位置旁边,这样就能使温和噬菌体转导原来不能转导的基因。例如已经知道大肠杆菌 Tl 座位旁边是温和噬菌体 $\phi 80$ 附着位置($att 80$)。利用上述方法将 lac 基因插入 Tl 位置,然后再用噬菌体 $\phi 80$ 进行感染,这样就能获得转导 lac 基因的 $\phi 80$,这 $\phi 80$ 同时也带有 F 因子。用这一方法可以得到转导任一指定基因的温和噬菌体^[27b]。

各个附加体间可以偶尔发生重组。如果首先获得带有 $att 80$ 以及某些标记的 F 因子的菌株,将它和另一带有一些其他标记的 F 因子的菌株进行杂交,选择 F 因子标记发生了重组的杂交子代,然后再用 $\phi 80$ 去进行感染,就能获得携带几个指定基因的 $\phi 80$ ^[28]。

以上这些方法在基因作用的研究方面都很有用,可以想见也必会在细菌的育种工作中发挥作用。利用附加体作为导致基因重组的手段可能比染色体重组更为有效,原因是附加体可以不依附于染色体而存在,所以受到染色体同源性的限制可能更小。此外,近来发现青霉菌的病毒能感染酵母菌^[29],所以通过转导而使霉菌和酵母菌之间发生基因重组也有可能。