

产黄青霉原生质体融合杂种的产青霉素能力及非强制选择杂种的探讨

肖信发 张兰英 杨艳玲

(华北制药厂抗菌素研究所, 石家庄)

4个产黄青霉选育系谱的14对营养缺陷型原生质体融合率为0.61—8.88%。原生质体经紫外光照射后融合,有可能在非选择性的CM上分离出杂合二倍体。系谱内杂合二倍体的青霉素产量与直接亲本是否比原始亲本显著减产有关。系谱间杂合二倍体中双亲与产量有关的基因之间没有明显的显隐关系或累加效应。系谱I与II的杂合二倍体F16②_c24的分离子HP7②-1显示出比原始亲本更好的选育潜力。

关键词 产黄青霉; 原生质体融合; 杂合二倍体; 分离子

近几年很多人探讨用原生质体融合技术选育优良抗生素菌种的可能性^[1]。Pesti等人^[2]报道,用来源不同、发酵能力不同的产黄青霉菌株融合得到了提高青霉素产量的杂种。Lopez Nito等^[3]报道,青霉素产生菌的低产生化突变株之间的融合杂种比两个直接亲本高产;低产与高产生化突变株之间的融合杂种产量界于双亲之间。本文比较来源及发酵能力不同的菌株间14个组合融合得到的杂合二倍体及部分分离子相对于亲本的青霉素产量;讨论紫外光诱导核的非强制融合,以及融合杂种的进一步选育趋势。

材 料 与 方 法

(一) 菌种

原生质体融合的原始亲本来自4个相隔很远的产黄青霉选育系谱。由它们选出一系列稳定的营养缺陷型作为直接亲本(表1)。

(二) 培养基

用于培养菌种的孢子、菌丝或原生质体再生的固体培养基(包括CM与MM),摇瓶试验用的种子培养基,发酵培养基及其它培养条件仿照以前报道^[4,5]或生产试验条件。

(三) 原生质体释放

采用0.5%纤维素酶与蜗牛酶混合液或单一1%纤维素酶溶液,以0.8M KCl或0.6M NaCl作渗透压稳定剂,33—34℃温育3—5h^[4]。

本文于1984年12月11日收到。

武汉大学生物系八一届毕业生康筱林、姚俊梅、孙公平参加部分工作;感谢北京微生物研究所副研究员梁平彦同志审阅文稿、支绶单催化剂苯菌灵;感谢本厂工程师章名春、贺秉坤、胡瑜君提供部分试验菌种。

表 1 用于原生质体融合的菌株的来源与遗传标记

Table 1 genetic markers and origins of strains used in the protoplast fusion

原始亲本 Primitive parents			直接亲本 Immediate parents			
来源 Origins	菌株 Strains	标记* Markers	菌株 Strains	标记 Markers	回复突变率 Reverse mutation frequency	来源 Origins
系谱 I Genealogy I	202	yg	Au1-22	yg,pro	$<8 \times 10^{-7}$	UV
	174	w	Au1-15	w,nic	$<5.8 \times 10^{-7}$	UV
			Au1-25	w,pro	$<1.44 \times 10^{-7}$	
			Au1-26	w,nic	$<4.3 \times 10^{-7}$	
系谱 II Genealogy II	48	y	Au2-1	y,thi	NT	UV
	204	w	Au2-7	w,bio	$<9.4 \times 10^{-5}$	UV
			Au2-8	w,ade	NT	
			Au2-9	w,thi	$<4.8 \times 10^{-6}$	
系谱 III Genealogy III	55	gg	Au3-3	gw,bio	$<5.8 \times 10^{-7}$	NTG
			Au3-6	pi,lys	$<5.8 \times 10^{-7}$	
			Au3-9	gw,metH	$<1.4 \times 10^{-5}$	UV
			Au3-14	pi,vit	$<5.0 \times 10^{-6}$	
系谱 IV Genealogy IV	6205	y	74-10-11	y,xan	$<1 \times 10^{-6}$	DES+ UV

* 本文采用的英文符号English signs in the paper.

孢子颜色 Conidium colour;

yg; 黄绿, w; 白, y; 黄, gg; 灰绿, gw; 灰白, pi; 粉色, dg; 深绿, pg; 浅绿, g; 绿;

营养要求 nutritional requirement;

pro; 脯氨酸, nic; 菸酸, thi; 硫胺素, bio; 生物素, ade; 腺嘌呤, lys; 赖氨酸, meth; 蛋氨酸, vit; 维生素, xan; 次黄嘌呤, und; 未确定;

其它 others

UV; 紫外光处理, NTG; 亚硝基胍处理, DES; 硫酸二乙酯处理, NT; 未测。

(四) 原生质体融合

基本同前报道^[5]。

(五) 单倍化处理

参照Peberdy等人^[6]的方法。

(六) 紫外光处理

按常规进行。灯管功率30瓦。

(七) 平阳霉素处理

参照贺秉坤方法^[7]。

管碟法测生物效价,检测菌为蕈状芽孢杆菌HB₂。以摇瓶试验相对效价表示菌株生产能力。在不同的融合组合中,各自以高产的原始亲本的平均青霉素效价作为100.0。

结 果 与 讨 论

(一) 原生质体融合率与杂合二倍体出现率

试验中原生质体融合率(0.01—8.88%)与融合产物异核体形成杂合二倍体孢子的频率(0.04—90%以上)波动较大,其高低与系谱内还是系谱间融合无关。

分离到的杂合二倍体具有生长快、菌落大、孢子颜色互补(如双亲孢子颜色分别为黄与白,则杂合二倍体孢子为绿色)等特点。它们在自然分离时比较稳定,不出现或极少出现亲本型菌落,但经单倍化剂对氟苯丙氨酸或苯菌灵处理后会出现明显的分离,产生各种亲本型与重组型分离(见表5、表6)。

(二) 系谱内近亲杂合二倍体的青霉素产量

系谱I的缺陷型Aul-15比它的姐妹株Aul-25明显低产,但并不导致它们分别作为直接亲本之一的杂合二倍体Aul-15/Aul-26与Aul-25/Aul-26的相应差异。这两个二倍体的青霉素产量都与原始亲本接近(表2)。

系谱I的近亲菌株202与174的缺陷型后代之间融合得到的杂合二倍体F5①与F5③比双亲有增产趋势(表2)。

上述例子中,直接亲本与原始亲本的产量比较接近,不低于高产原始亲本的80%。与此截然不同,表2所列系谱III的缺陷型菌株Au3-3与Au3-6的产量极低,低于原始亲本55的9%。由它们融合得到的杂合二倍体的产量虽然比直接亲本稍高,但仍然显著低于原始亲本55。

(三) 系谱间杂合二倍体的青霉素产量

系谱II菌株48及其缺陷型后代Au2-1的青霉素产量只有系谱I菌株202的一半或稍高于一半。系谱II菌株204青霉素产量达202的90%。204的缺陷型后代Au2-9、Au2-7和Au2-8的产量分别为202的82.1%、29.4%和2%以下。但是不管这些菌株差异如何,分别与202的缺陷型后代Aul-22融合得到的四种杂合二倍体的产量并无相应差异,都大约为高产亲本202的一半或稍高于一半(表3)。

系谱III菌株55的缺陷型后代Au3-9与Au3-14的产量也相差显著,同样不导致它们分别作为直接亲本与系谱I菌株202后代融合形成的杂合二倍体的相应差异。二倍体的产量都接近或低于202的一半(表3)。55极低产的缺陷型Au3-3、Au3-6和Au3-9分别与系谱I缺陷型Aul-26融合得到的杂合二倍体也接近或稍低于高产的系谱I原始亲本174的一半。系谱IV菌株6205的缺陷型后代74-10-11的青霉素产量为32.3,系谱I缺陷型Aul-25产量为116.2,两者的融合二倍体Aul-25/74-10-11的产量居间为70.7。

综上所述,系谱间融合所形成的杂合二倍体中,双亲与产量有关的基因无明显的显隐关系或累加效应,而似乎相互作用造成某种居间的产量。

(四) 紫外光处理原生质体对融合结果的影响

从表4可知,紫外光对亲本Aul-22与Au3-9的原生质体的杀伤作用使融合处理后在

表 2 系谱内菌株间原生质体融合得到的杂合二倍体的产青霉素能力
 Table 2 Penicillin productivity of heterodiploids from protoplast fusion
 between the same genealogy strains

系 谱 Genealogy	菌 株 Strains		菌落或摇瓶数量 Number of colonies or shake flasks		平均相对效价 Average relative titer	效价范围 Range of titer
			菌 落 Colonies	摇 瓶 Shake flasks		
I	杂合二倍体 Heterodiploids	Aul-15/Aul-26	20		107.0	81.0—145.5
		Aul-25/Aul-26	16		97.1	37.7—135.6
	原始亲本 Primitive parent	174	56		100.0	69.1—140.2
	直接亲本 Immediate parents	Aul-15	15		84.1	49.6—124.4
		Aul-25	44		116.2	70.8—145.2
		Aul-26	13		104.9	89.2—124.1
I	杂合二倍体 Heterodiploids	F5①	13		118.5	75.1—149.6
		F5③	47		111.2	55.3—151.2
	原始亲本 Primitive parents	202	23		100.0	66.6—115.0
		174	23		90.4	44.1—116.6
	直接亲本 Immediate parents	Aul-22		7	83.3	77.8—93.3
		Aul-26	11		100.0	81.7—115.2
II	杂合二倍体 Heterodiploid	Au3-3/Au3-6	19			≤21.3
	原始亲本 Primitiveparent	55	14		100.0	83.5—124.5
	直接亲本 Immediate parents	Au3-3	16			≤7.8
		Au3-6	15			≤8.3

CM上的再生率大大降低。照射3 min,再生率降低95.7%,对融合率影响不大;照射5 min,再生率降低99%,融合率显著降低。

经融合处理的原生质体在CM上常会长出双亲镶嵌菌落。在所有常规融合试验中,从未见这种镶嵌菌落出现杂合二倍体角变,只有经过MM强制生长才会出现杂合二倍体角变。但是上述经紫外光照射3min后融合的原生质体在CM上再生的49个镶嵌菌落中,发现两个长出了孢子颜色互补呈深绿色的角变。这种角变失去了双亲的缺陷型标记,呈原养型。如此得到的杂种F16②^c24(Aul-22/Au3-9)在自然分离时,观察323个菌落未见一个亲本型;但经茶菌灵处理后,却出现了显著的遗传性分离现象,既出现了双亲型菌落,又出现了新型菌落(表5)。营养要求试验证明,直接亲本的缺陷型标记又在一些分离分子中出现(表6),从而证实了F16②^c24的杂合二倍体本质。这一结果似乎与某些人认为的紫外光会干扰真菌的核配阻抑因子("KR")^[8],促进体细胞核融合的看法相

表 3 系谱间菌种原生质体融合得到的杂合二倍体的产青霉素能力
Table 3 Penicillin productivity of heterodiploids from protoplast fusion between different genealogies strains

菌 株 Strains		菌落或摇瓶数 Number of colonies or shake flasks		平均 相对效价 Average relative titre	效价范围 Range of titre	
		菌 落 colonies	摇 瓶 shak flasks			
系谱 I Genealogy I	原始亲本 Primitive parent	202	57	100.0	58.3—155.3	
	直接亲本 Immediate parent	Au1-22	7	83.3	77.8—93.3	
系谱 II Genealogy II	原始亲本 Primitive parents	48	5	3	48.7—50.7	
		204		90.0	83.9—97.1	
	直接亲本 Immediate parents	Au2-1	来源于 48 from		64.9	63.5—67.4
		Au2-7	来源于 204 from	3	29.4	25.6—34.8
		Au2-8		3	≤1.3	
Au2-9		3	82.1	76.0—85.7		
系谱 III Genealogy III	原始亲本 Primitive parent	55	22	68.1	39.2—92.6	
	直接亲本 Immediate parents	Au3-9	16		≤4.2 (除1个21.1外 except one 21.1)	
		Au3-14		3	56.9	48.0—63.0
杂合二倍体 Heterodiploids		Au1-22/Au2-1	32		60.6	46.1—75.4
		Au1-22/Au2-7	15		46.3	37.0—58.4
		Au1-22/Au2-8	11		58.4	30.4—81.7
		Au1-22/Au2-9	19		64.4	34.7—99.9
		Au1-22/Au3-9	146		43.9	25.2—71.7
		Au1-22/Au3-14	10		27.4	16.4—36.5
		Au1-22/Au3-9*	15		41.8	25.2—69.6
Au1-22/Au3-9**	30		16.9	12.0—23.1		

*,** 经紫外光处理的原生质体融合后, * 从MM上分离的; ** 从CM上分离的

After fusion of protoplasts treated by UV, * was derived from MM, ** from CM.

吻合, 暗示有可能直接用野生型的青霉素生产菌株进行原生质体融合杂交, 避免采用常会对生产带来不利影响的缺陷型。

表 4 紫外光处理亲本 Aul-22 与 Au3-9 的原生质体对融合率的影响

Table 4 Effect of treatment of protoplasts of parents Aul-22 and Au3-9 on their fusion frequency

紫外光处理 UV treatment	在 CM 上的再生率 Regeneration frequency on CM		融合率 Fusion frequency
	%	相对值 Relative value	
3 min	0.74	4.3	1.41%
5 min	0.177	1.0	0.32%
未处理 nontreatment	17.16	100.0	1.74%

表 5 杂种 F16②-C₂₄(Aul-22/Au3-9) 自然分离与诱导分离的比较Table 5 Comparison between induced and spontaneous segregation of hybrid F16①-C₂₄(Aul-22/Au3-9)

处 理 Treatment	菌落总数 Sum of colonies		亲 本 型 Parent form				小点状菌落 Colonies like dot		小绿菌落 Small green colonies		小白菌落 Small white colonies		角变菌落 Colonies with sector	
			Aul-22 型 form		Au3-9 型 form									
	数量	%	数量	%	数量	%	数量	%	数量	%	数量	%	数量	%
自然分离 Spontaneous segregation	323	100.0	0	<0.3	0	<0.3	63	19.5	0	<0.3	0	<0.3	0	<0.3
苯菌灵诱导分离 Benomyl induced segregation	1051	100.0	19	1.8	66	6.3	38	3.6	14	1.3	5	0.5	31	2.9

(五) 杂合二倍体分离子的青霉素产量

系谱 I 的近亲杂合二倍体 F5①-1(Aul-22/Aul-26) 经对氟苯丙氨酸处理后, 出现的各种亲本型与重组型分离离子都不比杂合二倍体或原始亲本高产, 却有明显低产的类型。

系谱 I 与 II 之间的远亲杂合二倍体 F9④(Aul-22/Au2-1) 经苯菌灵处理后出现的亲本型与重组型分离离子的产量变化范围比高产亲本 202 大 (表 6), 出现了比杂合二倍体 (见表 3) 高产的分离离子, 但未出现超过高产亲本的分离离子。

选育系谱 I 与 III 之间常规融合得到的远亲杂合二倍体 F11⑤-32(Aul-22/Au3-9) 经苯菌灵处理后出现的各种分离离子的产量分布与原始亲本及杂合二倍体相比, 朝低产方向伸展 (表 6)。

表 3 中划了一个星号 (*) 的 Aul-22/Au3-9 是紫外光诱导后融合, 以常规的 MM 强制选择方法得到的杂合二倍体, 其产青霉素能力与常规融合得到的杂合二倍体相当。划了两个星号 (**) 的 Aul-22/Au3-9 是紫外光诱导后融合, 并在非强制性的 CM 上再生分离出来的, 其青霉素产量比常规法得到的 Aul-22/Au3-9 低。但有趣的是, 它经单倍化剂处理后, 分离离子类型之多, 分离离子产量变化范围之大却大大超过后者。既出现了超亲

表 6 系谱间杂合二倍体经苯菌灵处理后出现的分离子类型及其产青霉素能力
 Table 6 Segregant types developed from benomyl treated heterodiploids between different genealogies and their penicillin productivity

杂合二倍体 Heterodiploids	分离子类型与标记 Segregant types and markers		菌落数 Colony number	平均相对效价 Average relative titer	效价范围 Range or titer
F9④ (Aul-22/Au2-1)	重组型 Recombinant type	g	38	81.3	20.4—118.0
	亲本型 Parental types	yg,pro	9		微量trace—68.9
		w,bio	1	微量trace	
	共计 sum		48		微量trace—118.0
F11⑤—32 (Aul-22/Au3-9)	重组型 Recombinant types	dg	19		微量trace—44.7
		pg,meth	5	27.3	5—46.3
	亲本型 Parental types	yg,pro	13		微量trace—55.3
		pi,meth	16		微量trace—11.5
共计 sum		53		微量trace—55.3	
F16②—C ₂₄ (Aul-22/Au3-9)	重组型 Recombinant types	dg	39		微量trace—46.9
		pg	5	31.9	22.5—52.8
		pg,meth	2	8.3	4.2—12.3
		pg,und	1	15.3	
		gw	2		微量trace—17.7
		gw,und	1	16.6	
		w	1	136.6	
		yg,pro	5	40.8	12.8—50.8
		gw,meth	15		微量trace—29.0
共计 sum		71		微量trace—136.6	
原始亲本 Primitive parent 202 (control)	202 (对照)		57	100.0	58.3—155.3

的低产分离子，也出现了比杂合二倍体显著超产、接近高产亲本的分离子（表6中杂合二倍体F16②—C₂₄的分离子）。HP7②-1就是这样的高产分离子。

(六) 分离子HP7②-1的诱变效果

用作对照的两个菌株中，HP2②-131为高产的原始亲本202与杂合二倍体F16②—C₂₄同步经苯菌灵处理后分离到的典型后代；55^s-84为另一原始亲本55的纯化后代。表7说明，紫外光诱发的分离子形态变异率界于双亲之间；平阳霉素造成分离子形态变异率比双亲高一倍左右。

从图1与图2可见，经紫外光或平阳霉素诱变后，分离子HP7②-1的后代与两个原始亲本后代相比，产青霉素能力分布在较高的效价区段，说明分离子有较大的选育潜力。

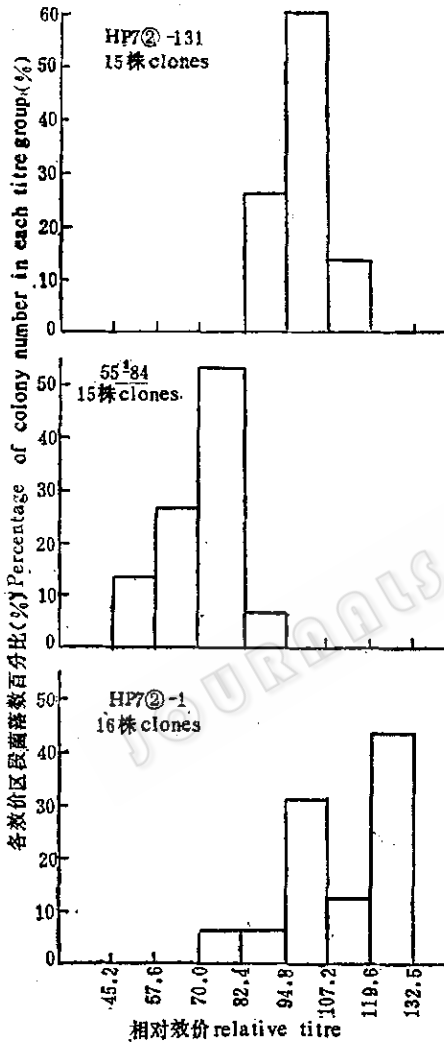


图 1 分离子HP7②-1与原始亲本经平阳霉素处理后的青霉素效价分布。

Fig. 1 Penicillin titre distribution of segregant HP7②-1 and its primitive parents after being treated by bleomycin No.5

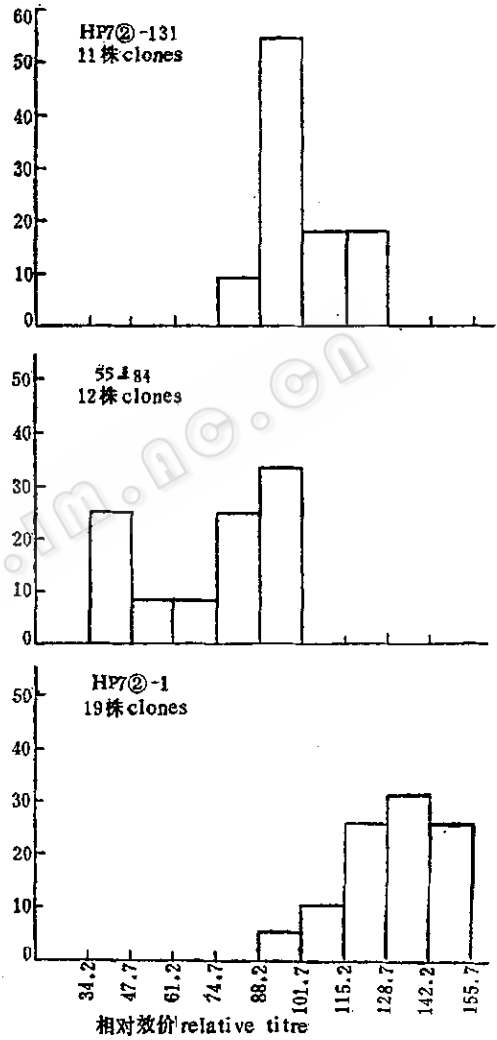


图 2 分离子HP7②-1与原始亲本经紫外光处理后的青霉素效价分布。

Fig.2 Penicillin titre distribution of segregant HP7②-1 and its primitive parents after being treated by UV

表 7 诱变剂处理分离子HP7②-1与亲本引起的死亡率与菌落形态变异率
 Table 7 Percentage of colony morphological variation and mortality induced by mutagens treatment of segregant HP7②-1 and the parents

菌 株 Strains	紫外光处理 UV treatment (30w,44cm,3min)				平阳霉素处理 Bleomycin No. 5 treatment(10μg/ml,60min)				自然分离 Spontaneous segregation	
	死亡率 Mortality	菌落总数 Sum of colonies	形态变异的 Varied in morphology		死亡率 Mortality	菌落总数 Sum of colonies	形态变异的 Varied in morphology		菌落数 Colo- ny numb- er	形态变异率 Percentage of mor- phological variation (%)
			菌落数 colony number	%			菌落数 colony number	%		
分离子 HP7②-1 Segregant	99.79	535	246	46.0	98.21	146	20	13.7	82	<1.2
亲本 HP7②-131 Parents 55-S-84	99.81	377	204	54.1	98.77	125	8	6.4	73	<1.4
	99.82	352	142	40.3	97.32	91	7	7.7	112	<0.9

参 考 文 献

- [1] 肖信发: 抗生素, 8(4):261—265,1983.
- [2] Pesti, M. et al.: Programme and Abstracts of the Fifth International Protoplast Symposium, p.54, 1979.
- [3] Lopez Nito, M. J. et al.: Proceedings of the Sixth International Fermentation Symposium, p.57, 1980.
- [4] 梁平彦等: 植物生理学报, 7(1):1—10, 1981.
- [5] 梁平彦等: 遗传学报, 8(4):287—293, 1981.
- [6] Peberdy J. F. et al.: *Molec. Gen. Genet.*, 157(3):281—284, 1977.
- [7] 贺秉坤等: 中国遗传学会第二次代表大会暨学术讨论会论文摘要汇编, 48—49, 1983.
- [8] Caten, C. E. et al.: *Ann. Rev. Phytopathol.*, 15:295—318, 1977.

RESEACHES ON PENICILLIN PRODUCTIVITY OF *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* PROTOPLAST FUSION HYBRIDS AND UNFORCED SELECTION

Xiao Xinfu Zhang Lanying Yang Yanling

(Institute of Antibiotics, North China Pharmaceutical corporation, Shijiazhuang)

Protoplast fusion frequencies of 14 combinations of auxotrophs from 4 *Penicillium chrysogenum* genealogies were 0.01—0.88%. when protoplasts were irradiated by UV before being treated by PEG, heterodiploids were isolated from regenerated colonies on CM. Penicillin productivity of the heterodiploids between the same genealogy strains is related with the fact that whether the productivity of immediate parents is markedly lower than that of primitive parents or not. The dominance or recessiveness of the heterodiploids gene from different genealogy strains in penicillin productivity were not obvious and there was no additive effect between the genes as well. The segregant HP7②-1 of heterodiploid F16②-24 between genealogy I and III appeared better potentiality of breeding than the primitive parents.

key words

Penicillium chrysogenum; protoplast fusion; heterodiploids; segregants