

## 酿酒酵母与糖化酵母的种间原生质体融合 及其融合子的鉴定

李桃生 陈士怡

(杭州大学生物系, 杭州)

本文报道了酒精生产菌株K氏酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* 的HUK-1 (*his*<sup>-</sup>, 二倍体, 但在我们所试的5种产孢培养基上均不产孢)与糖化酵母 *Saccharomyces diastaticus* 7C (*arg*<sup>-</sup>, *a*)的种间原生质体融合, 其营养标记互补的融合频率约是 $2.07 \times 10^{-6}$ — $3.40 \times 10^{-5}$ 。这些融合子曾在选择培养基MMS或MMO上连续传代10次, 以促进两亲核的融合。融合子的酒精发酵特性、细胞形态、体积大小、DNA含量、繁殖速率、发酵强度以及产孢能力等方面的观察和测定结果表明, 均不同于双亲菌株。用显微操作器解剖了个别原养型融合子HU-KDF-185的4孢子子囊, 在获得的93个单孢株中, 其淀粉发酵特性和遗传标记均有双亲类型的分离或重组现象。

上述实验结果充分证明了不同倍性的酵母之间可以通过原生质体融合获得种间杂种。

**关键词** 原生质体融合; 融合子; 酿酒酵母; 糖化酵母; 融合产物

七十年代发展起来的原生质体融合技术, 有可能克服“性”因素所造成的基因隔离, 避开有性过程, 扩大基因交流和重组范围。1977年, Sipiczki 和 Ferenczy 等人首先将此方法成功地应用于酵母的原生质体融合研究<sup>[1]</sup>。迄今, 研究者们已完成了一系列酵母的种内、种间和属间的诱导融合, 并在一定程度上获得了各种形式的融合重组体、杂合体或杂种<sup>[2-5]</sup>。因此, 原生质体融合为酵母的重组研究和遗传改良提供了新的途径<sup>[6-7]</sup>。

鉴于酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 是酒精工业和饮料酒的重要生产菌, 但它不能直接发酵淀粉, 所以在利用淀粉质原料发酵生产酒精时, 必须先经糖化, 将淀粉转化为可发酵性糖, 才能被酵母利用产生酒精<sup>[8, 9]</sup>。而现有的糖化酵母 *Saccharomyces diastaticus* 虽然具有淀粉发酵基因(STA)<sup>[10]</sup>, 并通过杂交选育

使某些特性得到改良, 但是它们发酵可溶性淀粉和糊精的能力仍然一般, 甚至缓慢<sup>[11]</sup>, 因此不能作为淀粉发酵酒精的生产菌株。所以, 近年来国内外一些研究者包括我们的实验室, 都试图通过杂交、原生质体融合或基因转化等方法构建具有淀粉糖化酶活性的酵母新菌株<sup>[12, 13]</sup>, 或进一步改良糖化酵母以实现淀粉直接发酵成酒精的一步法生产<sup>[9]</sup>。本文就是我们实验室在这一领域通过原生质体融合改建酵母细胞研究的部分实验结果(第I报)。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌株

#### 1. HUK-1(*his*<sup>-</sup>)系杭州酒厂的生产

本文于1986年5月5日收到。

中国科学院科学基金资助课题。

参加部分实验工作的有罗玉萍、倪宝富、赵小立、金国英、滕俊琳、陈新年和董微星等。

菌株K氏酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* (二倍体)。本室用 5%EMS诱变处理120min, 30℃, 获得的组氨酸营养缺陷型。经二年多来的连续传代试验, 其遗传标记稳定。K氏酿酒酵母及其 HUK-1 菌株在下述5种产孢培养基上均不产孢, 也不能直接发酵可溶性淀粉。

2. 5101-7C(arg<sup>-</sup>, a) *Saccharomyces diastaticus* 系日本 Tamaki, H. 教授赠送。具有淀粉发酵基因STA 1。(简称7C)。

## (二) 培养基

1. 完全培养基 (YEPD): 成分参照文献[14]。不加琼脂即为YEPD液体培养基。

2. 基本培养基 (MM): 成分参照文献[15]。

3. 完全高渗培养基: 蔗糖高渗培养基 (YEPDS) 为YEPD + 0.5M蔗糖;

山梨糖醇高渗培养基 (YEPDO) 为YEPD + 0.75M山梨糖醇。

4. 基本高渗培养基: 蔗糖高渗培养基 (MMS) 为MM + 0.5M 蔗糖; 山梨糖醇高渗培养基 (MMO) 为 MM + 0.75M 山梨糖醇。

5. 产孢培养基: 麦氏 (McClary)、克氏 (Kleyn)、高氏培养基成分参照文献[16]; 福氏 (Fowell) 和 GT 培养基成分分别参照文献[14]和[17]。

6. 葡萄糖发酵培养基 (YEPGF) (%) : 葡萄糖 12, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.25, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.025, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.025, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2。

7. 淀粉发酵培养基 (YEPSF): 成分同 YEPGF, 只是以 3%可溶性淀粉代替12%葡萄糖。

8. 遗传标记分离和重组鉴定培养基: MMH: MM + L-组氨酸 (35ml/l) [18];

MMA: MM + L-精氨酸 (35ml/l) [18]; MMHA: MM + L-组氨酸 + L-精氨酸。

上述所有基本固体培养基和基本高渗培养基均用国产纯化琼脂 (生化试剂), 所有培养基的 pH 皆调节到6.0, 0.8kg/cm<sup>2</sup>灭菌15min。制备原生质体的蜗牛酶液和原生质体融合诱导剂 (PEG + CaCl<sub>2</sub>) 均于用前配制, 0.45μm 细菌滤膜抽滤灭菌。

## (三) 原生质体的制备和融合

1. 原生质体的制备: 原生质体制备方法基本按前报 [19], 并有所改进。对数生长早期的细胞用柠檬酸缓冲液 (pH6.0) 离心洗涤二次, 使最终细胞浓度达10<sup>8</sup>个/ml; 用0.1% β-巯基乙醇预处理30min, 洗涤后用蜗牛酶液脱壁。蜗牛酶系用柠檬酸磷酸缓冲液 (pH6.0) 配制成 2% 浓度, 内含 0.7MKCl, 0.1% EDTA-Na<sub>2</sub>。脱壁方式采用 (1) 两亲株细胞 (10<sup>8</sup>个/ml) 按1:1比例先混合, 再进行酶解脱壁; (2) 两亲株细胞分别酶解脱壁后, 再混合诱导融合。

2. 原生质体的诱导融合: 用 0.4M CaCl<sub>2</sub> 离心洗涤双亲原生质体二次, 加入融合诱导剂 PEG (MW3900—4800) 和 CaCl<sub>2</sub>, 使其最终浓度分别为 40% 和 40mM, 于30℃水浴保温 30min。然后用柠檬酸磷酸缓冲液配制的0.75M山梨糖醇溶液洗涤, 洗去PEG和CaCl<sub>2</sub>后, 适当稀释并分别涂布于MMS、MMO、YEPDS和YEPDO等高渗再生培养基上, 同时用双亲的细胞和原生质体分别涂布于MMS和MMO培养基上, 28℃恒温培养, 以便选择营养标记互补的融合子和检测亲株营养缺陷遗传标记的回复突变率。

本实验制备原生质体时的渗透稳定剂为0.7M KCl, 原生质体诱导融合时改为 0.75M 山梨糖醇, 融合子的再生则用

0.75M 山梨糖醇和 0.5M 蔗糖以资比较。

#### (四) 细胞DNA含量的测定

1. DNA提取: 酵母细胞的DNA提取方法按照文献[20,21]稍加改进。待测菌株在YEPD斜面上于28℃培养4天, 使细胞同步于静止期, 收集干重约100mg的菌体, 用蒸馏水离心洗涤, 继而在0—4℃条件下用0.5M HClO<sub>4</sub>冷洗二次; 然后于70℃再用0.5M HClO<sub>4</sub>热提取DNA三次, 每次15min, 总提取液为5ml。

2. 二苯胺比色: 基本按文献[22]进行。

#### (五) 融合子减数分裂产物的遗传学研究

1. 产孢及其子囊孢子解剖: 将原养型融合株涂布于福氏产孢培养基上, 28℃培养2—3天。用显微操作器解剖正常的4孢子子囊, 取出孢子并单独培养, 即得该融合子的减数分裂产物——单孢株。

2. 淀粉发酵能力的测定: 按杜氏管测定法<sup>[16]</sup>。

3. 遗传标记的分离和重组分析: 将所获单孢株分别用牙签点种在MM、MMH、MMA和MMHA鉴别培养基, 28℃培养, 比较观察菌落生长情况。

## 结果和讨论

### (一) β-巯基乙醇对原生质体形成率和再生率的影响

β-巯基乙醇能裂解酵母胞壁蛋白的二硫键, 有利于蜗牛酶对酵母细胞壁的降解作用<sup>[23]</sup>, 提高原生质体的形成率。但有人认为, 对酵母原生质体的制备并非必需<sup>[4]</sup>。我们观察到0.05M的β-巯基乙醇对K氏酿酒酵母营养细胞的正常生长和繁殖即表现出明显的抑制作用。而在制备原生质体的过程中加入一定浓度的β-巯

表1 β-巯基乙醇对酵母原生质体形成率和再生率的影响

Table 1 Effect of β-mercaptoethanol on protoplast formation rates and regeneration rates for yeast *Saccharomyces cerevisiae*

处理方式 * Means of treatment	浓度 Concentration (M) 结果 Results (%)	0	0.01	0.1	1.0
实验 I Exp. I	形成率 Formation rates	92.51±1.16	97.35±1.19	99.28±0.17	99.93±0.04
	再生率 Regeneration rates	15.80±0.58	11.86±0.70	3.35±0.24	0.54±0.14
实验 I Exp. I	形成率 Formation rates	92.98±1.48	98.28±0.96	99.76±0.22	99.98±0.01
	再生率 Regeneration rates	15.56±0.89	10.45±0.94	2.47±0.54	0.46±0.17

\* I. β-巯基乙醇预处理30min, 洗涤后用2%蜗牛酶液脱壁

Pretreated with β-mercaptoethanol tested concentration for 30min at 30℃, and then incubated for 60min in 2% snail enzyme solution

II. β-巯基乙醇+2%蜗牛酶液同时脱壁处理

Incubated for 60min in 2% snail enzyme solution containing β-mercaptoethanol tested concentration

基乙醇,虽然能有效地提高原生质体的形成率,但其再生率却明显下降了。实验结果列入表1。

由表1可见,在制备酵母原生质体时,0.01—1.0M的 $\beta$ -巯基乙醇无论是预处理,还是与酶液混合同时处理,其原生质体的形成率都表现出随浓度的增加而提高,而再生率却随浓度的增加而降低的现象。不过,两种不同处理方式的实际效果稍有差异,就原生质体的形成率而言,实验I总是低于实验II,而其再生率却是I高于II。这些都表明 $\beta$ -巯基乙醇本身对原生质体的生活力有一定不良影响。因此,除了 $\beta$ -巯基乙醇的浓度因素外,还可能与原生质体或球状体接触 $\beta$ -巯基乙醇的时间有关。因为 $\beta$ -巯基乙醇不仅作用于酵母胞

壁蛋白,利于蜗牛酶对细胞壁的降解作用,促进原生质体的形成;而随着处理时间的推移, $\beta$ -巯基乙醇进而又作用于原生质体的质膜蛋白,从而造成质膜损伤而影响原生质体壁的再生。所以,欲制备高生活力的酵母原生质体, $\beta$ -巯基乙醇的浓度和处理时间都是必须考虑的重要影响因素。

## (二) 营养互补原养型融合子的检出

经两种不同处理方式制备的原生质体,用融合诱导剂PEG和CaCl<sub>2</sub>诱导处理后,分别涂布在MMS和MMO基本选择培养基上,28℃培养。在上述培养基上形成的菌落即被认为是两亲株原生质体融合形成的营养互补融合子。表2是我们实验的部分结果。

表2 HUK-1 (his<sup>-</sup>) 和 7C (arg<sup>-</sup>) 的种间原生质体融合试验

Table 2 Interspecific protoplast fusion of *Saccharomyces cerevisiae* HUK-1 (his<sup>-</sup>) and *S. diastaticus* 7C (arg<sup>-</sup>)

原生质体的制备方式*	亲株原生质体总数/ml Amount of parental protoplast	营养标记互补原养型融合子数/ml Amount of prototrophic fusants			融合频率 Fusion frequency		
		MMS上形成的菌落数 Amount of fusant on MMS	MMO上形成的菌落数 Amount of fusant on MMO	总菌落数 Amount of colony on MMS & MMO	MMS	MMO	总频率 Total fusion frequency
实验 I Exp. I	$1.76 \times 10^8$ (HUK-1 $0.94 \times 10^8$ , 7C $0.82 \times 10^8$ )	$1.80 \times 10^3$	$1.84 \times 10^3$	$3.64 \times 10^3$	$1.02 \times 10^{-6}$	$1.05 \times 10^{-6}$	$2.07 \times 10^{-6}$
实验 II Exp. II	$2.06 \times 10^8$ (HUK-1 $1.12 \times 10^8$ , 7C $0.94 \times 10^8$ )	$3.68 \times 10^3$	$3.32 \times 10^3$	$7.00 \times 10^3$	$1.79 \times 10^{-5}$	$1.61 \times 10^{-5}$	$3.40 \times 10^{-5}$

\* I. 双亲细胞先按1:1比例混合,再酶解脱壁

Cell suspensions ( $10^8$  cell/ml) of HUK-1 and 7C strains to be fused were mixed previously in 1:1 ratio before the treatment of snail enzyme solution

II. 双亲细胞分别酶解脱壁,再混合诱导融合

Cells of two parental strains HUK-1 and 7C were treated by using snail enzyme solution separately, and then protoplasts of two parents were mixed to induce fusion

亲株营养标记的回复突变率: HUK-1, 0; 7C,  $3.66 \times 10^{-8}$

Reverse mutation frequency of parental nutrient makers: HUK-1, 0; 7C,  $3.66 \times 10^{-8}$

从MMS和MMO上出现的菌落数及其频率来看,两者基本相似。不过, MMS上的菌落直径一般比 MMO 上的大 2—3

倍,这与谭蓓英等人<sup>[4]</sup>的实验结果相反,是否与实验菌株的种属不同有关,有待以后进一步试验观察。总之,这一结果表明

蔗糖和山梨糖醇都可作为融合子再生的渗透稳定剂, 且效果相似。考虑到蔗糖试剂易得而价廉, 融合子生长快, 所以本实验大多数情况下都采用蔗糖作为渗透稳定剂。

表 2 中的实验数据也表明制备原生质体的程序不同, 其融合频率则分别为  $2.07 \times 10^{-8}$  和  $3.40 \times 10^{-5}$ , 两者相差达 16 倍之多。其原因可能是两亲株在相同时间内的原生质体形成率不同所造成的。在我们的实验中, 糖化酵母系单倍体菌株, 细胞较小, 又具有一定程度的凝集性, 所以在制备原生质体的试验中, 同一时间内的原生质体形成率, 7C 菌株总是低于 HUK-1 菌株。

本实验所获得的原养型融合子, 均分别在其检出培养基 MMS 或 MMO 上连续传代 10 次, 以促进双亲异种核的融合而获得稳定的种间融合杂种<sup>[25]</sup>。

我们还观察到融合子在 MMS 或 MMO 上的最初几代, 细胞芽殖表现出某种程度的不规则现象, 如出现花粉管萌发状, 蝌蚪状或哑铃状等等, 只有经过多次传代之后才趋于稳定。其中有 22 株融合子在传代过程中先后失去增殖能力。试验结果表明, 主要是这些融合子在其增殖中发生双亲核的分离, 分裂所形成的双亲类型的细胞, 因其营养缺陷都不能在 MMS 或 MMO

基本培养基上继续增殖和生长。当我们在这种菌落消失的 MMS 或 MMO 平板上滴入麦芽汁、或 YEPD、或组氨酸或精氨酸时, 曾有菌落复现。此外, 我们还注意到在传代过程中, 细胞体积有逐渐变小的现象, 但最终稳定成一定大小的细胞类型, 这是否是这些融合子在分裂过程中, 双亲染色体出现某种程度的不亲和性而发生个别染色体被排斥或丢失所引起。在此, 仅是作者的推测, 仍需进一步实验加以证实。

### (三) 融合子的鉴定

鉴于本实验的主要目的在于借助于原生质体融合, 把糖化酵母的淀粉发酵基 (STA) 转移到酿酒酵母中去, 以达到改建酵母细胞的目的。因此, 对融合子的鉴定和筛选程序如下:

1. 淀粉发酵性测定: 首先用杜氏管法测定了所获融合子的淀粉发酵性能, 结果有 33.20% 的融合子能不同程度地发酵可溶性淀粉, 但其发酵速度一般在 4.5—15 天, 慢于 7C 亲株。

2. 葡萄糖发酵性测定: 用  $\text{CO}_2$  减量法对上述能发酵可溶性淀粉的融合子进一步进行葡萄糖发酵强度和速率的测定。结果见表 3 和图 1。

通过可溶性淀粉的发酵性测定、葡萄糖发酵强度和酒精转化率的比较试验, 以

表 3 酒精发酵比较试验结果

Table 3 Comparative test of ethanol production of the parent strains and the fusants  
HU-KDF-185, HU-KDF-240 at 30°C

菌株 Strains	$\text{CO}_2$ 减量 $\text{CO}_2$ production (g)	酒精含量 Ethanol production (%)	葡萄糖转化率 Transformation ratio of glucose (%)	还原糖* Reduce sugar (%)
HUK-1	$2.25 \pm 0.14$	3.20	52.18	0.84
7C	$2.42 \pm 0.16$	3.91	63.75	0.36
HU-KDF-185	$2.51 \pm 0.10$	5.15	83.97	0.11
HU-KDF-240	$2.49 \pm 0.12$	5.00	81.52	0.15
K 氏酵母	$2.48 \pm 0.15$	5.00	81.52	0.15

\*费林试剂热滴定法<sup>[24]</sup>

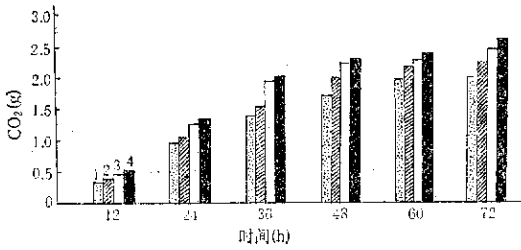


图 1 亲株和融合子 HU-KDF-185, HU-KDF240 发酵速率的比较  
Fig. 1 Comparison of fermentation rate of the parental strains and the HU-KDF-185, HU-KDF-240 at 30℃  
1. HUK-1 2. 7C 3. HU-KDF-240  
4. HU-KDF-185

及在振荡通气条件下的增殖速率的比较研究(图2),我们从所获融合子中筛选到二株发酵性能较优良的融合子 HU-KDF-185 和 HU-KDF-240。其中, HU-KDF-185 菌株无论在酒精转化率还是发酵强度,以及增殖速率等方面均高于目前酒精生产

菌株 K 氏酵母。对 HU-KDF-185 菌株的发酵生物学特性及遗传分析研究将另文发表。

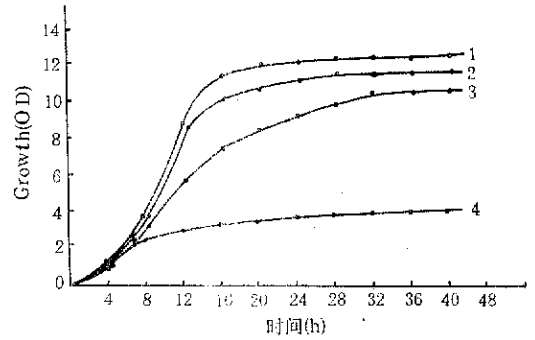


图 2 亲株和融合子增殖速率比较  
Fig. 2 Comparison of vegetative multiplication rate of the parental strains and the fusants HU-KDF-185, HU-KDF-240.  
1. HU-KDF-185 2. HU-KDF-240  
3. 7C 4. HUK-1

3. 融合子的形态学比较观察: 图 3

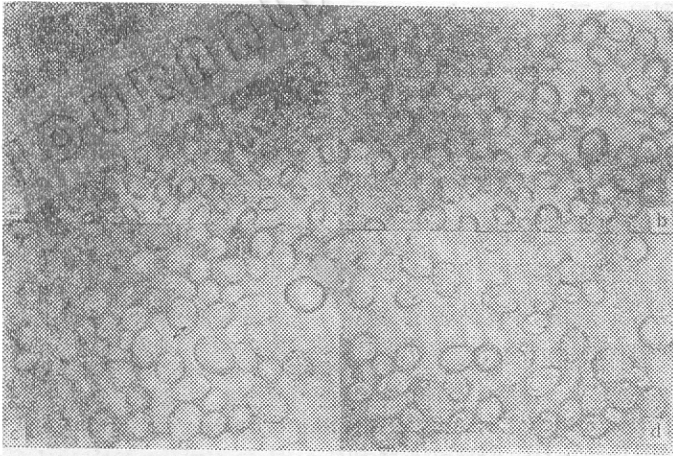


图 3 融合亲株 7C、HUK-1 与原养型融合子 HU-KDF-185、HU-KDF-240 的形态学比较观察  
Fig. 3 Morphological observation of the parental strains and the fusants HU-KDF-185, HU-KDF-240  
a. 7C b. HUK-1 c. HU-KDF-185 d. HU-KDF-240

是融合亲株 HUK-1、7C 和原养型融合子 HU-KDF-185 和 HU-KDF-240 的光学显微镜照片。

4. 细胞 DNA 含量的测定: 从表 4

所列各菌株的 DNA 含量可以看出, 融合子 HU-KDF-185 和 HU-KDF-240 的 DNA 含量与其两融合亲株 DNA 含量之和基本相符。

表 4 融合亲株及其融合子 HU-KDF-185, HU-KDF-240 的 DNA 含量比较  
Table 4 Comparison of DNA content per cell of the parental strains and their fusants HU-KDF-185, HU-KDF-240

菌 株 Strains	DNA 含量 ( $10^{-11}$ mg/细胞) DNA content ( $10^{-11}$ mg/cell)			产孢能力 Sporulation
7C	2.67	±	0.51	-
HUK-1	4.28	±	0.48	-
HU-KDF-185	6.73	±	0.32	+
HU-KDF-240	6.85	±	0.68	+

5. 融合子减数分裂产物的表型分析: 原养型融合株 HU-KDF-185 和 HU-KDF-240 经二年多的传代试验, 遗传性状稳定; 并且, 在产孢培养基上获得了低频率形成子囊孢子的能力, 2—3 个孢子的子囊占多数, 也没有发现超过 4 个孢子的子囊存在。在我们的实验中, 酿酒酵母与糖化酵母的种间融合细胞获得了产孢能力, 究其原因可能是糖化酵母源于酿酒酵母<sup>[10]</sup>, 它仍能与相对交配型的酿酒酵母交配, 所以被认为是获得了淀粉糖化酶活性的酿酒酵母衍生种<sup>[20]</sup>。据此, 我们认

为, 由于这两种酵母起源上的内在关系, 其遗传背景存在着一定程度的相似性; 因此, 融合细胞中的双亲细胞质和细胞核易于协调配合, 而导致微弱产孢能力的形成。

我们用显微操作器解剖了 HU-KDF-185 菌株的 4 孢子子囊 44 个, 最终获得 93 个单孢株, 其孢子的解剖成活率为 52.84%, 其中只获得 5 个 4 孢子子囊的完整单孢株。这些单孢株的主要生理生化 and 遗传性状列入表 5。

子囊孢子及其发育成的单倍体细胞

表 5 融合子减数分裂产物的表型分析  
Table 5 Phenotype analysis of meiotic products of the nutritional complementary fusant HU-KDF-185

表 型 Phenotype	组氨酸缺陷型 (his <sup>-</sup> )	精氨酸缺陷型 (arg <sup>-</sup> )	组氨酸和精氨酸缺陷型 (his <sup>-</sup> arg <sup>-</sup> )	原养型 Prototroph	其 他 Others	合 计 Total
可溶性淀粉发酵 Soluble starch fermentation						
发 酵 Fermentation	10 10.75%	4 4.30%	2 2.15%	9 9.68%	0	24 25.81%
不发酵 Non-fermentation	34 36.56%	5 5.38%	4 4.30%	25 26.88%	0	69 74.19%
合 计 Total	44 47.31%	9 9.68%	6 6.45%	34 36.56%	0	93

均系酵母营养细胞核减数分裂的产物。一般来说, 杂种后代性状的分离或重组, 必然反映出杂种本身的遗传组成及其双亲的遗传背景。表5中的实验数据表明, 在可溶性淀粉发酵方面, 出现了发酵和不发酵两种表型分离, 其频率分别为25.81%和74.19%, 分离比接近1:3, 这与Tamaki用普通杂交方法获得酿酒酵母与糖化酵母的杂种分离结果一致<sup>[10]</sup>。同时, 原养型融合子的减数分裂产物——单孢株, 其遗传标记除有亲株类型的分离外, 还出现亲株遗传标记重组新类型, 这标志着两个不同种的双亲基因, 组在融合子的减数分裂中发生了分离和交换, 也说明我们所获得的HU-KDF-185融合株是一个经过核配而形成的稳定的合核型(Synkaryon)融合细胞。这与Tsuboi<sup>[27]</sup>在*Saccharomyces*

*cerevisiae*交配型同型二倍体(a/a或 $\alpha/\alpha$ )和单倍体的原生质体融合试验中, 获得异核型三倍体融合子产孢的结果不尽相同。因为该异核型融合子产孢是在双亲的核-质相互作用下, 各自的核进行减数分裂的结果, 所以在同一个融合子中出现3—8个孢子的现象, 分析表明, 全部是亲株类型而没有双亲遗传标记发生重组的类型。上述实验结果都证明了我们所获得的酿酒酵母与糖化酵母种间融合杂种的真实性。而且, 从HU-KDF-185融合杂种的发酵强度, 酒精转化率, 繁殖速率都显著超过亲株, 并且比目前酒精生产菌株K氏酿酒酵母稍优的实验结果来看, 原生质体融合不仅为真核生物的体细胞遗传学提供新的研究方法, 而且还有可能为工业酵母菌株的改良开辟新的途径。

### 参 考 文 献

- [1] Bottcher, F. et al., In "Advances in protoplast research" edited by Ferenczy, L. et al., Akademiai Kiado, Budapest, pp.99—104, 1980.
- [2] Morgan, A.J., In "Protoplasts 1983" edited by Potrykus, I. et al., Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart, pp. 155—166, 1983.
- [3] 那家德郎, 酿造协会杂志, 79(4):210—215, 1984.
- [4] 谭蓓英等, 真菌学报, 2(2):110—118, 1983.
- [5] Taya, M. et al., Agric. Biol. Chem. 48(19):2239—2243, 1984.
- [6] Freeman, R.F. et al., In "Yeast Genetics" edited by Spencer, J.F.T. et al., Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, 243—253, 1983.
- [7] Gunge, N. et al., In "Molecular Breeding and Genetics of Applied Microorganisms" edited by Sakaguchi and Okanishi, Kodansha Ltd. 94—103, 1980.
- [8] 华南工学院等, 酒精与白酒工艺学, 轻工业出版社, 1983.
- [9] Lalluce, C. et al., Appl. Environ. Microbiol., 48(1):17—25, 1984.
- [10] Tamaki, H., Mol. Gen. Genet., 184:205—209, 1978.
- [11] Phaff, H. J. et al., "The life of yeast", Cambridge, Mass. Harvard Univ. Pr., 1978.
- [12] Spencer, J.F.T. et al., Ann. Rev. Microbiol., 37:121—142, 1983.
- [13] 居乃斌, 应用微生物, (1):41—44, 1985.
- [14] 倪宝富等, 遗传学报, 12(2):93—101, 1985.
- [15] 刘祖洞等, 遗传学实验, 人民教育出版社, pp. 25—27, 1980.
- [16] 中国科学院微生物研究所《常见和常用真菌》编写组, 常见和常用真菌, 科学出版社, 268—269, 1978.
- [17] Gunge, N. et al., Japan. J. Genet., 53(1):41—49, 1978.
- [18] (日)微生物研究法讨论会编, 程光胜等译, 微生物学实验法, 科学出版社, p.229, 1981.
- [19] 李桃生等, 杭州大学学报(自然科学版), 13(2) 248—250, 1986.
- [20] Ogur, M., Arch. Biochem. Biophys., 40:178—184, 1952.
- [21] Stewart, P.R., In "Method cell Biology" edited by Prescott, D.M., Academic press, New York, 12:122—123, 1975.
- [22] 张龙翔等, 生物化学实验方法和技术, 人民教育出版社, p.219, 1982.
- [23] Falcone, G. et al., Science, 124:272, 1956.
- [24] 北京大学生物系生物化学教研室编, 生物化学实验指导, 人民教育出版社, pp.24—27, 1981.



[25] 梁平彦等：微生物学报，22(3):248—256，1982。

[26] Yamashita, I. et al. : *Agric. Biol. Chem.*, 48(1):137—141, 1984.

[27] Tsubio, M. : *Mol. Gen. Genet.*, 182:1—6, 1981.

## INTERSPECIFIC PROTOPLAST FUSION BETWEEN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND *SACCHA- ROMYCES DIASTATICUS*, AND IDENTIFICATION OF THEIR FUSION PRODUCTS

Li Taosheng      Chen Shiyi

(Department of Biology, Hangzhou University, Hangzhou)

This paper presents the results of interspecific protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* HUK-1 (*his*<sup>-</sup>, diploid of non-spo-reforming on five sporulating media tested) and *Saccharomyces diastaticus* (*arg*<sup>-</sup>, *a*) in the presence of 40% polyethene glycol (PEG, MW 3900—4800) and 40mM CaCl<sub>2</sub>. The fusion frequency resulted from complementation of the parental nutrient markers is about  $2.07 \times 10^{-6}$ — $3.40 \times 10^{-5}$ . The fusants obtained were transferred continuously for 10 generations once every two days on selective media MMS or MMO in order to force two parental nuclear fusion in the fusants.

Comparative studies of cell size, cell morphology, DNA content per cell, vegetative multiplication rate, fermentation ability and sporulating ability etc. between the fusants and the parental strains show quite different. 44 four-spore asci from the prototrophic fusant HU-KDF-185 were dissected with a micromanipulator and each spore allowed to grow into colony, but only 93 single-spore clones were obtained. Phenotype of these single-spore clones all show segregation or recombination in soluble starch fermentation and genetic markers.

The above experimental results sufficiently demonstrate that interspecific hybrids between yeast species with different ploidy in *Saccharomyces* can be obtained through protoplast fusion.

### Key words

Protoplast fusion; fusant; *Saccharomyces cerevisiae*; *Saccharomyces diastaticus*; fusion product