

啤酒酵母同源多倍体系列的研究*

徐 浩 林桂坚 江慧修 那淑敏

(中国科学院微生物研究所, 北京)

关于啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)倍体系列的研究前人已有报导^[1-4]和讨论^[5]。直到目前为止,因该酵母染色体计数技术上的困难,对倍体系列的检验还不能用染色体计数的方法,一般说来,倍体的检验是依靠下面五种标准:

- (1) 细胞或其核大小的测量^[2];
- (2) 用遗传方法检验^[1];
- (3) 用辐射致死突变侧证^[8];
- (4) 用核酸含量检验^[9];
- (5) 用某些生理特性如发酵、呼吸检验^[6]。

上述方法各有利弊,但显然(1)(3)(5)这三种方法只能作为参考标准,不宜用为确证标准,因为这些指标与细胞的倍体数并不一定成比例。(2)和(4)两法较为可靠,可是(2)法对检验同源多倍体比较困难、麻烦,而以(4)法最为方便和可靠。过去用(1)和(5)两法选育同源多倍体的工作虽有过报导,但因上述原因,它们的结果是可怀疑的。关于用药剂诱导多倍体酵母的问题,过去的报导也有不同的意见。据报告,樟脑^[7]、茚^[6]、苯胺^[3]、甚至丁醇都能诱致多倍体,而一般对秋水仙碱的作用则看法不一^[3],特别在近年来大多数认为它不能诱致酵母的多倍体^[15]。

为了探讨多倍体酵母在工业应用上的可能性,我们建立了一套同源多倍体,根据细胞大小及脱氧核糖核酸(DNA)的含量进行了检验,并做了分类学标准及细胞学的一般观察。

一、材料与方法

所用酵母是我所保藏的2.576号菌株,属于啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen),据 Косиков 氏的观察,这一菌株的单孢子分离物不会自我二倍化(Self-diploidization)^[10],因而适于作为建造多倍体的素材。我们检验多倍体系列诸菌株的标准是DNA在每个细胞内的含量。虽然理论上每套染色体的DNA含量是恒定的,但由于酵母在不同生长期分裂指数有所不同,因此我们首先测定了各株酵母的生长曲线,以确定测定DNA的最适时间,然后在这个生长期取样,测定DNA含量,以进行多倍体系列的确证。

(一) 生长曲线的测定

首先用平板法测繪了生长曲线,决定出在我们的实验条件下同一生长期中各个菌株的生长时间,以决定测DNA的取样时间。

* 本工作承施履吉先生指导。薛禹谷先生、蔡金科、张其玖、王标等同志给予诸多帮助,吴素莹先生惠借仪器,并致謝。

本文1964年1月18日收到。

(二) 酵母细胞核的染色

Giemsa 染料的配制,依 McClung 法^[11],在 pH 7 的缓冲液中进行染色。染色程序基本上按 Ganansan 法进行,即取 24 小时菌株涂片,并用铁酸蒸汽固定 30 秒钟,然后用氯仿固定 3 分钟。染色前先用流水冲片半小时,再用 1N HCl 水解 10—12 分钟,冲洗后移入 2 毫升 Giemsa 染料加 48 毫升磷酸氢二钠-柠檬酸的 pH 7 缓冲液的混合液中染色(至少 3 小时),然后透化,封藏。

(三) 每个细胞的平均 DNA 含量测定

采用改进的 Schneider 法提取 DNA,并用 Dische 氏二苯胺法比色测定^[16]。所用干粉量为 800.0 毫克。由于每次要将分析出的 DNA 含量折算成每个细胞的含量,因此,每次另取 100.0 毫克干粉,用玻璃珠撞散,配成 250 毫升的悬液,用 Neubauer 血球计数板计数。查明每毫克干粉的细胞数后,用它去除每毫克干粉的 DNA 含量,即得每个细胞的平均 DNA 含量。计数时依照 Oguri^[9]的标准,凡是有芽露出的,不论大小,一律作为另一个新细胞计算。

1. 干粉的制备:

取生长 48 小时的酵母菌体,用蒸馏水连续洗涤 3 次,然后按照以下步骤处理:

(1) 取 10 克洗过的菌体加 40 毫升 10% 的冷三氯乙酸(TCA)液,在 5℃ 以下迅速抽滤。这一过程重复三次。

(2) 再用 150 毫升 95% 的乙醇将上述菌体抽滤一次。

(3) 用 3:1 的乙醇-乙醚混合液 30 毫升,在 90℃ 水浴中处理上述菌体,沸腾 5 分钟,随后抽滤。

2. 比色测定:

称取生长 48 小时菌株制成的干粉 800.0 毫克,加少量 95% 乙醇及石英砂磨碎,用 5% TCA 溶液 4 毫升,在 90℃ 浸提 20 分钟,在 1000 g 下离心 15 分钟,取上清液。这一浸提过程重复三次(第二、第三次各用 5% TCA 3 毫升)。将三次所得的上清液合并,定容至 10 毫升。取此上清液作 Dische 氏二苯胺反应^[16],其中所用试剂:冰醋酸和浓硫酸系北京化工厂出品的一级品, DNA 钠盐系 B. D. H. 出品,经用 Fiske 和 Subbarow 定磷法测定^[18],含 DNA 量为 88.6%。用国产 72 型分光光度计进行比色,比色槽内径 1 厘米。各批样品比色的光密度都在 0.3 以上,所得到的每毫克干粉的 DNA 毫克数除以每毫克中的细胞数,即为每个细胞的 DNA 平均含量。

(四) 多倍体的建立

1. 选种:

(1) 取 2.576 号菌株,预培养后,移种到 Kleyn 氏孢子培养基^[13]上,待生出孢子后立即按照 Kоси́ков 改进方法^[17],用 Zeiss 厂的滑动式显微操作器解剖刚成熟的子囊,挑取一个子囊孢子移入盖片上的 15 Brix 的麦芽汁微滴内,然后培育在以饱和的 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 溶液维持湿度的容器内^[14], 28℃ 培育 24 小时,俟单个子囊孢子生成多个营养细胞后,用直角形平头白金钩针移入麦芽汁琼脂斜面上生长,就成为可能是单倍体的单细胞菌系。此菌株留待 DNA 测定予以确证。

(2) 2.576 的显微操作单细胞分离株系,即为待测的二倍体菌株。

(3) 取 2.576 原种或其它镜检初筛株,在 28℃ 培育 24 小时后,无菌离心洗涤,然后用 0.2% 的秋水仙碱水溶液在 28℃ 处理 48 小时,铺成平板,生成彼此分开的单菌落后,挑到麦芽汁斜面上。斜面菌株生长好后,用目镜测微尺测量细胞的大小,并与原种的细胞大小相比较。选取转管后仍然稳定的大细胞菌株,是为初筛株。然后用显微操作器分离初筛株中的巨大细胞,生长成单细胞株系后,是为待测的多倍体菌株。

2. 菌株的验证:

(1) 用 DNA 定量方法求出各待测菌株每个细胞的 DNA 平均含量,并与原种的 DNA 含量相比较,以决定各菌株的倍体数。

(2) 經 DNA 定量确証过的多倍体各菌株依照 Lodder 氏的鉴定标准进行了检查。糖的发酵是用毛细管法,糖的同化是用生长谱法进行的。依照糖的发酵及同化来确定各菌株是否仍具有原种的主要鉴定特征。

(3) 在细胞形态方面进行了各菌株细胞核染色,以检查 DNA 增多的细胞是否发生了多核现象。观察是在全消色的油镜下进行的。

在进行了上述检查后,倍体数目才被最终地予以肯定。

经过确证后的各菌株的 48 小时培养物又用 Zeiss 厂出品的螺旋目镜测微尺在 600 倍率下精密地测量了细胞的长度,每菌株至少量取 40 个细胞以计算其体积,借以考察细胞体积与倍体数之间的关系。

二、实验结果

(一) 生长曲线 由生长曲线可以看出,原种、 h_1 、35S 及 66t 在实验的条件下都具有约 4 小时左右的迟缓期,4 小时以后进入繁殖最活跃的对数期,36 小时以后进入稳定期。因此,我们在测定这四个菌株的 DNA 含量时,都是采用 48 小时——即稳定期的初期——的生长物作为材料。稳定期的优点是出芽较少,细胞不易成团存在,在计算细胞数目时较为方便。

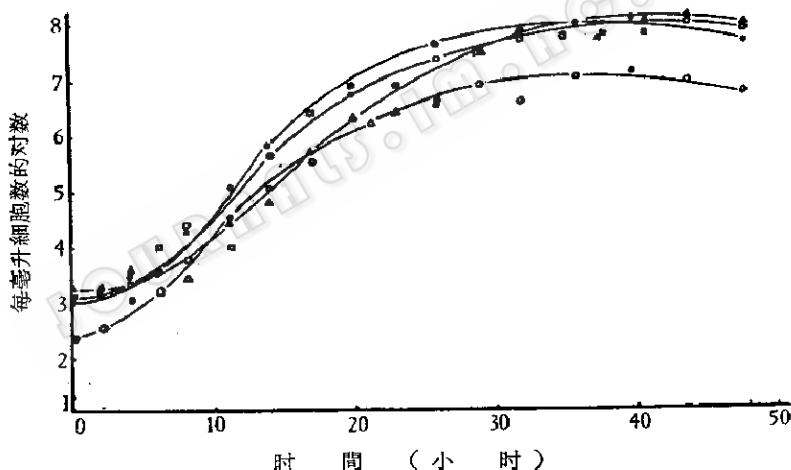


图1 倍体系列各菌株的生长曲线

○ 单倍体 (h_1) ● 二倍体 (2.576) △ 三倍体 (35s) □ 四倍体 (66t)

(二) 各生长期酵母细胞核的染色 对于不同生长期的细胞核形态进行了染色观察。以原种为典型,可以看出在不同生长期时核形态是很不相同的,由形态上也可以看出,根据生长期取样以进行 DNA 分析是完全必要的。

(三) 多倍体系列建立的实验

(1) 由原种生出的子囊中解剖出单个的子囊孢子,繁殖后,得出了 h_1 号菌株,经过 DNA 测定后证实是单倍体菌株。单倍体的菌落较小,在斜面上不易连成一片,生长势最差。细胞小,亚圆形,易成团块。

(2) 根据啤酒酵母的生活史,原种的单细胞分离株系,经测 DNA 后定为二倍体。二倍体生长势最旺盛,细胞椭圆形,分散。

(3) 原种经秋水仙碱溶液处理后,用平板稀释法,挑出 504 个菌株,镜检后由其中选

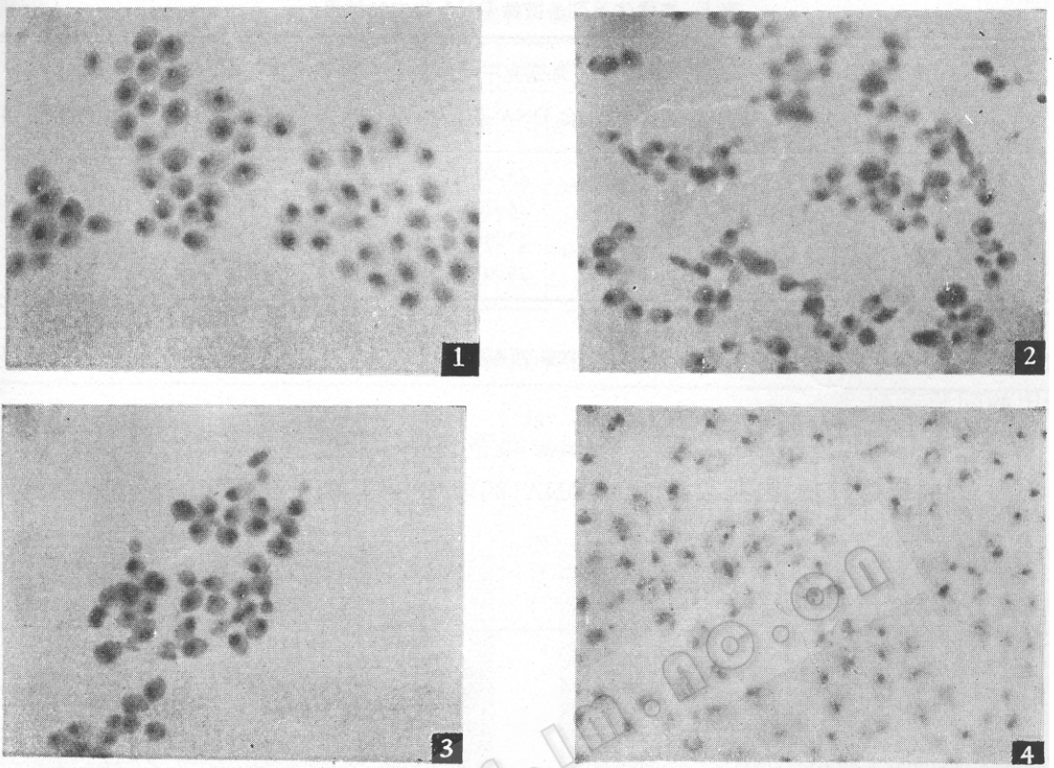


图2 原种的细胞在各生长期的核形态(放大700倍)

- ① 迟缓期的细胞,罕有正在分裂的核;
- ② 和 ③ 是对数期的细胞,正在活跃增殖;
- ④ 稳定期将近结束的细胞,细胞质着色变淡,核呈小细颗粒状,不再呈圆形。

出 45 个菌株,经过单细胞分离,并测定 DNA 后,得到一株稳定的三倍体菌株,即 35S。这个菌株细胞较原种大,但生长势不如原种。

(4) 镜检法选出后但尚未经单细胞分离的 35 号再用秋水仙碱溶液处理,在 500 株平板上挑出的菌株中,初筛出 69 个菌株。单细胞分离后,得到的 66t 经过 DNA 测定证实是四倍体株系。四倍体生长势亦较弱,细胞较延长。

取一、二、三、四倍体各菌株的48小时生长物,测定 DNA 后所得的结果表明,各菌株的每个细胞的平均 DNA 含量确成 1:2:3:4 的比例。同时也表明,高倍体菌株每个细胞的平均 DNA 含量的增加显然与单位重量中细胞数目的减少——亦即细胞体积的增大——有关。

(四) 多倍体系列各菌株的主要分类特征的检验及细胞学的观察与测量

(1) 前述四个菌株的糖的同化与发酵测定结果

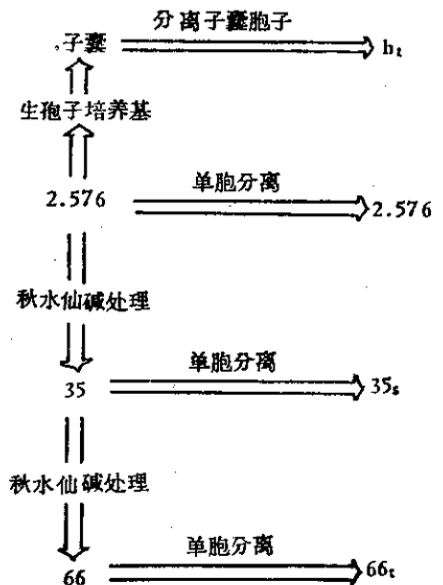


图3 所得到的多倍体系列各菌株的株系来源

表 1 多倍体系列各菌株 DNA 测定的结果

菌株	数据	实验次数	每毫克干粉中的细胞数	每毫克干粉中含 DNA 毫克数	DNA 含量 ($\times 10^{-11}$ 毫克/细胞)	置信区间 ($\times 10^{-11}$ 毫克/细胞)
h ₁		5	4.44×10^7	24.02	6.12 ± 0.32	5.30—6.94
2.576		5	2.79×10^7	26.20	11.4 ± 0.46	10.2 —12.6
35S		6	1.85×10^7	27.08	17.8 ± 0.43	16.7 —18.8
66t		5	1.19×10^7	25.91	26.4 ± 1.36	22.9 —29.9

如表 2 所示。可以看出各菌株依然具有啤酒酵母的鉴定特征,从而证明了它们确实是诱导出的同源系列。

(2) 取上述各菌株,固定后用 Giemsa 染色,结果如图 4。可以看到每个细胞仍然只具有一个核,无多核现象,从而证明了 DNA 的增加,确系由于染色体倍数增加所致。

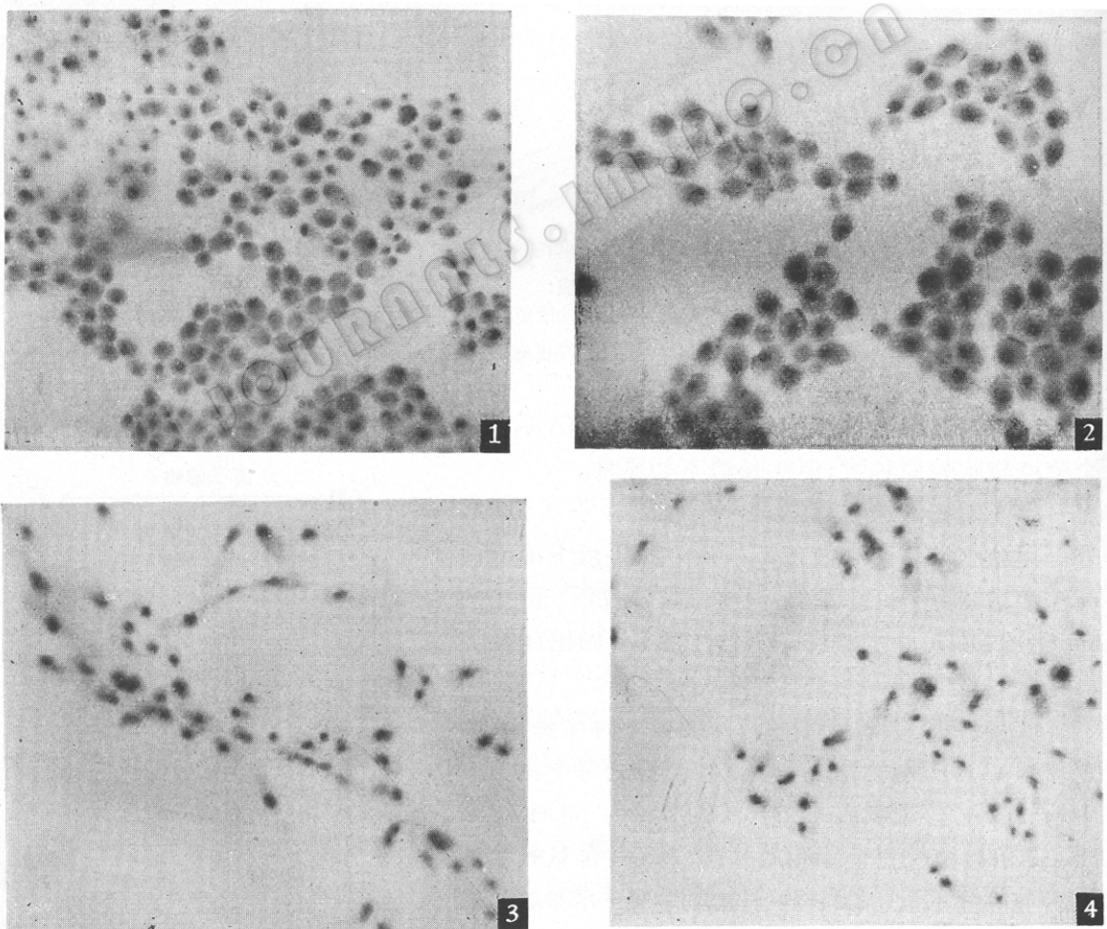


图 4 Giemsa 核染色后的各菌株细胞核的形态,放大 900 倍。依图片号码顺序依次为一、二、三、四倍体

(3) 用螺旋测微尺测得上述各菌株的体积如表 3。它们之间体积的比例约为 1:1.4:3:4,各菌株细胞的大小,除二倍体外,接近于互成简单的整数比。

表 2 多倍体系列諸菌株發酵与同化糖类的結果

菌 株	試 驗		葡 萄 糖		麥 芽 糖		蔗 糖		半 乳 糖		乳 糖		棉 子 糖		蜜 = 糖		纖維 = 糖	
			同 化		同 化		同 化		同 化		同 化		同 化		同 化		同 化	
	發 酵		發 酵		發 酵		發 酵		發 酵		發 酵		發 酵		發 酵		發 酵	
h ₁	+++	+++	+	++	+	++	+	+	-	-	+	+		-		-		-
2.576	+++	+++	+	+++	+	++	+	+++	-	-	+	+		-		-		-
35S	+	++++	+	++++	+	++++	+	+	-	-	+	++		-		-		-
66t	+	+++	+	+++	+	++++	+	+	-	-	+	+		-		-		-

表 3 多倍体系列菌株細胞的体积

菌 株	数 据	平均长度 (微米)		体 积 (微米 ³)	长轴尺度 (微米)		短轴尺度 (微米)	
		长 轴	短 轴		最 大	最 小	最 大	最 小
h _k		4.90±0.23	4.90±0.23	62.4	9.62	2.40	9.62	2.42
2.576		6.57±0.22	4.58±0.21	83.2	11.00	2.86	8.14	1.94
35S		10.34±0.47	5.83±0.23	185	18.26	6.82	9.90	1.94
66t		15.03±1.03	5.72±0.27	258	32.94	6.38	8.14	1.94

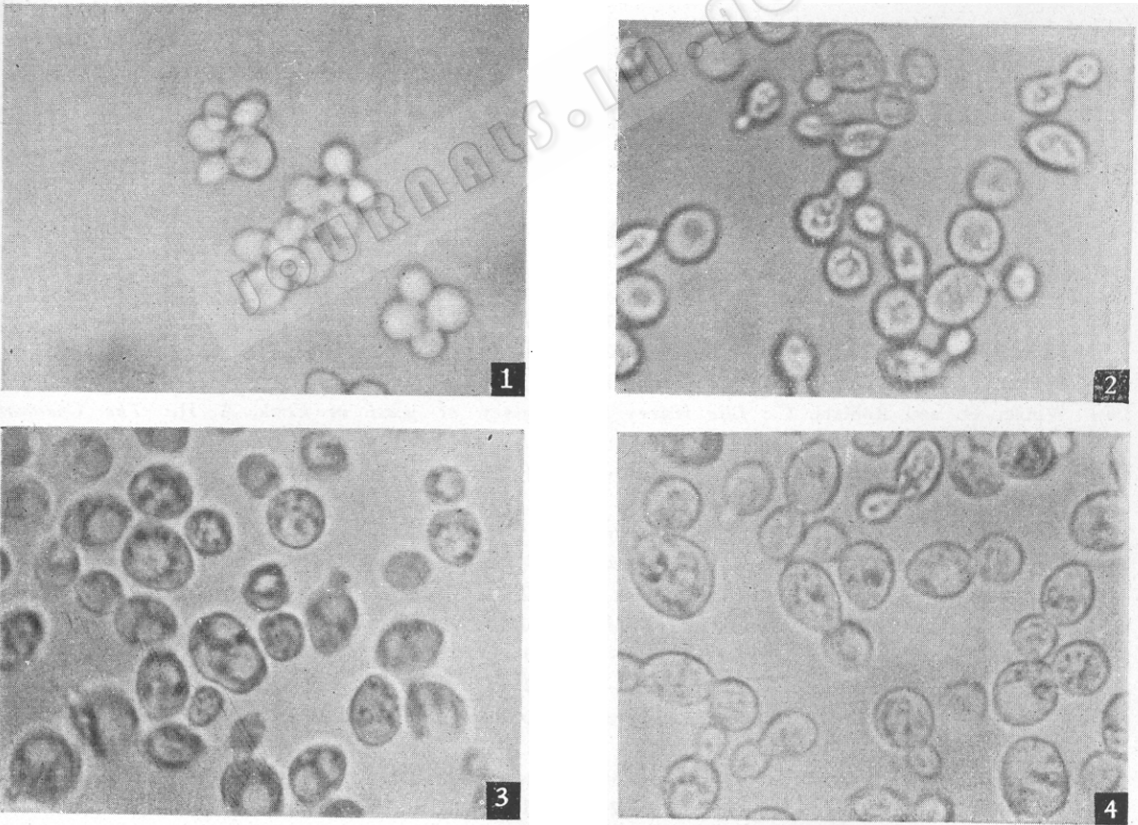


图 5 多倍体系列活細胞的照片。放大1000倍。依图片号碼順序为一、二、三、四倍体

三、討 論

关于用秋水仙碱誘导同源多倍体的工作,虽然在早期文献中曾有人报道过^[2],但仅是

根据细胞体积得出的结果, Winge 氏对此曾表示怀疑^[5]。用较可信的方法建立的同源多倍体系列迄今尚未见诸报道。此外, 对高等植物而言, 秋水仙碱虽然是公认的不引起点突变的优良的多倍体诱致剂, 但有些微生物学者则认为秋水仙碱不能用来诱致酵母多倍体^[15]。我们采用秋水仙碱获得并经确证为一至四倍的多倍体系列, 侧证了酵母核分裂与高等植物核分裂的共同性。这一套系列依然具有原菌株的主要分类特征, 而且细胞具单核, 细胞体积亦循倍体数目而有所增加。在我们的工作中除了看到在细胞体积方面一和二倍体不成比例外, 另外在建立多倍体的过程中也遇到细胞体积增大而 DNA 含量不增加的情况, 说明体积增大的现象并不一定全是多倍体所引起的。由此可见, 用体积的增大来检定多倍体酵母并不是可信的方法。

四、摘 要

用秋水仙碱诱导 *Saccharomyces cerevisiae* No. 2.576 获得以下结果:

(1) 用单孢分离及秋水仙碱溶液处理, 获得一套同源多倍体系列, 包括: 单倍体、二倍体、三倍体、四倍体。

(2) 经 DNA 测定, 该同源多倍体系列的 DNA 平均含量分别为: (6.12 ± 0.32) , (11.4 ± 0.46) , (17.8 ± 0.43) 和 $(26.4 \pm 1.36) \times 10^{-11}$ 毫克。

(3) 测量该同源多倍体系列的细胞体积分别为: 62.4, 83.2, 185 和 283 立方微米。

(4) 用秋水仙碱溶液处理过的这一套多倍体系列, 仍具有原菌株的分类特征, 而且细胞是单核的。

参 考 文 献

- [1] Lindegren, C. C. and Lindegren, G.: *J. Gen. Microbiol.*, 5:885—893, 1951.
- [2] Bauch, R.: *Naturwiss.*, 29, 32, 33, 503—504, 1941.
- [3] Bauch, R.: *Naturwiss.*, 29, 32, 33, 687—688, 1941.
- [4] Scheda, R.: *Arch. Mikrobiol.*, 45:65—100, 1963.
- [5] Winge, O. and Roberts, C.: *Life history and cytology of yeast. in* Cook, A. H.: *The Chemistry and Biology of Yeasts*, 1958.
- [6] Mitra, K.: *Biophy. et Biochem. Acta*, 8:615—124, 1952.
- [7] Levan, A.: *Hereditas*, 33:457—514, 1947.
- [8] Mortimer, R. K.: *Radia. Res.*, 9:312—326, 1958.
- [9] Ogur, M. et al.: *Arch. Bioch. Biophy.*, 40:175—184, 1952.
- [10] Косиков, К. В.: *Успех. совр. Биол.*, 53: 307—320, 1961.
- [11] Jones, R. M.: *McClung's Handbook of Microscopical Technique*, 3rd ed. 1950.
- [12] Ganesan, A. T.: *Stain Technol.*, 33:115—121, 1958.
- [13] Kleyn, J. G.: *Wall. Lab. Comm.*, 17:91—102, 1954.
- [14] A, S, T, M. Standards: *Recommended practice for maintaining constant relative humidity by means of aqua solution part 6*, 1955.
- [15] Rippel-Baldes, A.: *Grundriss der Mikrobiologie*, 3te Aufl., 1955.
- [16] Glick, D.: *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 1 and 6, 1958.
- [17] Косиков, К. В.: *Генетика дрожжей и методы селекций дрожжевых культур*, Изд. Акад. Наук. СССР, 1954.
- [18] Fiske, C. H. and Sabbarow, Y.: *J. Biol. Chem.*, 81:629, 1929.

AN AUTOPOLYPLOID SERIES OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Hsu Hao Lin Guay-jian Jian Huey-shiou Na Shu-min

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking)

With *Saccharomyces cerevisiae* No 2.576 as starting strain and colchicine as polyploidizing agent in this work the following have been obtained or found out.

(1) An autopolyploid series has been obtained in *S. cerevisiae* by the single ascospore isolation and by the treatment with colchicine solution. This series consists of haploid, diploid, triploid, and tetraploid.

(2) DNA determinations showed that the average DNA contents per cell for these strains are $(6.12 \pm 0.32) \times 10^{-11}$, $(11.4 \pm 0.46) \times 10^{-11}$, $(17.8 \pm 0.43) \times 10^{-11}$, and $(26.4 \pm 1.36) \times 10^{-11}$ mg respectively.

(3) The cell volumes of the polyploid series have been determined as 62.4, 83.2, 185, and 258 respectively.

(4) The taxonomic characteristics of the polyploid series are unchanged after the treatment with colchicine solution and each cell has only one nucleus.