

紫外綫对日本裂殖酵母菌的輻射效应* **

蔡金科 門大鵬

(中国科学院微生物研究所, 北京)

紫外綫对酵母菌属 (*Saccharomyces*) 輻射效应的研究, 早在 30 多年以前就已开始。Lacassagne^[19], Wyckoff 等^[33] 研究过紫外綫单色光对葡萄酒酵母的损伤, Надсон 等^[9] 研究过紫外綫引起啤酒酵母細胞形态的变化, 以后又有許多学者从事这方面的工作。紫外綫对裂殖酵母的誘变研究, 只有 Leupold^[22] 报告过紫外綫对粟酒裂殖酵母的誘变效应。

日本裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces japonicus*) 亦名日本八孢酵母 (*Octosporomyces japonicus*)^[6]。它的細胞大, 营养細胞为单元体, 染色体 $n = 6$, 核分裂过程很清楚。因而, 是研究輻射效应的良好材料。

材料与 方法

試驗菌株 日本裂殖酵母菌 AS、2.1147 按照 Косиков 法用显微操作器从一个子囊內順序分离八个子囊孢子, 将所得到的七株单孢菌株在 Burkholder 合成培养基上进行全部 B 族維生素的营养測定。証明所有測定的单孢菌株只需要維生素环己六醇、烟酸、生物素和泛酸, 就能正常生长。选用其中之一单孢菌株 SJ-20 号供进一步試驗用。

培养基 測定实验菌株及生化变株所用的培养基。1) 基础培养基: Burkholder 合成培养基的无机盐加 2% 葡萄糖, 供測定生化变株时前培养用。

2) 最低培养基: 即原始菌株能在其上生长的培养基。其成分为: 1 升基础培养基中加入以下 B 族維生素: 环己六醇 10 毫克; 泛酸 2 毫克; 烟酸 2 毫克; 生物素 20 微克。

3) 完全培养基: 麦芽汁(10 度)加 0.5% 酵母膏。

合成培养基的洋菜是按 Одинцова 法。先用自来水冲洗, 再用 95% 酒精浸泡約 5 天, 低温烘干备用。

細胞处理方法 取在麦芽汁斜面上連續轉管两次的菌一白金环, 接种于用蛋白澄清的 16 度麦芽汁中(40 毫升麦芽汁/150 毫升三角瓶), 30°C, 靜止培养 20—22 小时。离心后, 用无菌水洗滌三次, 再加入适量的生理盐水, 置冰箱中过夜(約 18 小时)。用力搖动使細胞分散, Thom 血球計数器計数后, 将原菌稀释至 2×10^7 細胞/每毫升。供照射时使用。

照射时, 将联接稳压器的 15 瓦紫外光灯 (Philips 牌, 波长以 2534 Å 为最强***) 先开灯 20 分钟, 調正好磁力攪拌器, 取 10 毫升試驗菌液傾入离紫外光灯 30 厘米的 9 厘米培养皿中。每間隔 30 秒钟取样 0.1 毫升。細胞存活率的測定, 是在麦芽汁洋菜平板上进行, 30°C, 培养 5 天計数。照射剂量用相对剂量時間表示。全部实验是在紅灯下完成, 以防光复活作用。

生化变株的篩选采用夹层法^[21]。生化变株測定的步驟是: 照射后的菌液, 用夹层法接种于最低培养基上, 培养 5 天, 加入完全培养基, 繼續培养 18—24 小时, 挑出第二次生长出来的单个小的菌落, 接种

* 本文經方心芳、相望年二位先生审阅, 并提出意見, 敬致謝意。

** 刘惠平同志曾参加部分工作。

本文 1964 年 6 月 26 日收到。

*** 紫外光灯的波长及其强度系中国科学院物理研究所測定, 特此致謝。

在麦芽汁斜面上。活化一代后,取一小白金环菌加于 5 毫升生理盐水中。离心后,加入 1 毫升基础培养基, 30℃ 培养过夜;第二天取一白金环菌悬液接在最低培养基平板上, 30℃, 培养 4 天观察。三次都不形成菌落者,即初步认为是生化变株。然后进行单胞分离纯化。测定其营养要求,作进一步分类。

镜检紫外綫对日本裂殖酵母細胞的生物学效应,是将用夹层法挑出的菌株,接种在麦芽汁或麦芽汁斜面上, 30℃ 培养 3 天或更长,进行镜检并照相。显微照相用蔡司 NF 型显微镜; Apl, 1.4 (消球差聚光器 aplanatischen kondensor), 90× (Apochromat 1.3), 滤光片 BG33, 胶卷 Agfa 135 (17°Din)。

結果与討論

一、紫外綫对日本裂殖酵母菌的失活作用

SJ-20 号营养細胞为单元体。如存活曲綫所示(图 1), 紫外綫剂量在一定范围内,存活曲綫呈对数曲綫,即单击曲綫。但在高剂量时就有越軌現象,即出現“拖尾”現象。紫外綫引起酵母菌单元体細胞存活曲綫的結果是不一致的。Caldas 等^[14], Delong 等^[15]用紫外綫照射酵母菌单元体細胞的存活曲綫为对数曲綫,而 Warshaw^[31], Sarachek 等^[27]及 Pomper 等^[26]則得到 S 型存活曲綫。我們得到的为对数曲綫。关于“拖尾”現象可能有多种因素引起:单元体細胞間的結团,单元体細胞間出現二倍体化細胞,实验菌所处的生理状态的不同,以及由于芽細胞的存在^[13,19,25]。日本裂殖酵母菌单元体細胞对紫外綫的抗性出現“拖尾”的原因,除了不形成芽細胞外,其他因素都会产生影响。我們在細胞学的观察中,发现有少数細胞的核已分裂为二,而横隔膜尚未形成,这也会导致出現“拖尾”現象。

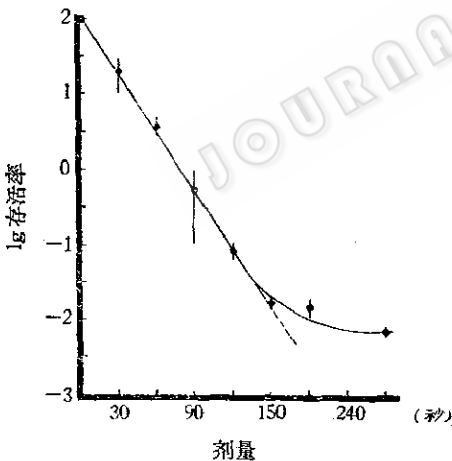


图 1 紫外綫剂量与日本裂殖酵母菌細胞失活間的关系

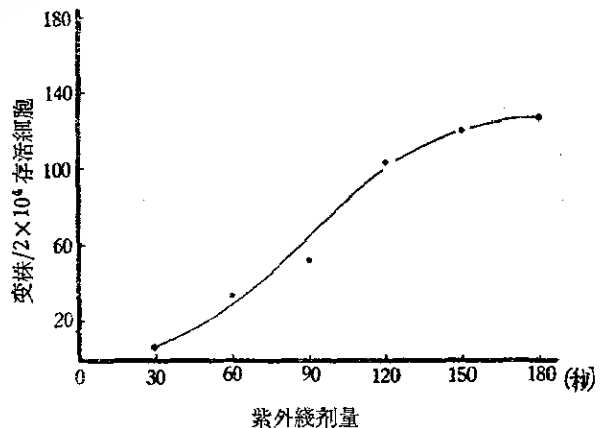


图 2 紫外綫对日本裂殖酵母菌的誘变頻率

二、紫外綫的誘变頻率

如图 2 所示,生化变株的数目随着紫外綫的剂量增高而增加,在 150 秒时,突变頻率曲綫上升变慢,在 180 秒时达到最高峯,以后突变頻率又大大地降低(表 1)。这种型式的突变頻率曲綫在用其他微生物的研究工作中曾有报导。突变頻率下降的原因还不清楚。将已得到的生化变株用生长图譜法进行生长因素的测定,結果列于表 2。

表 2 指出紫外綫所引起的变株的营养要求是多方面的,这可能与紫外綫对細胞內新陈代谢的改变多向性有关。

三、紫外线对细胞分裂的影响

鏡檢指出,有些菌株生孢子的能力比原始菌株強,几乎全部細胞都能形成子囊孢子;相反,有些菌株連續觀察 6—30 天,未曾見到形成子囊,只进行营养繁殖;此外,还观察到个别菌株能形成少数結合子,却不能形成子囊,或仅形成 2—4 个子囊孢子(图版 I)。

James 等人^[18]指出,紫外线对酵母細胞的有絲分裂过程有刺激作用,細胞分裂的时间縮短。可能系輻射引起一部分被照射細胞的細胞膜透性的改变,由細胞內分泌出核酸物

表 1 紫外线诱发日本裂殖酵母菌的突变频率

紫外线剂量(秒)	存活总菌数	突变菌株数	突变频率 (变株/ 2×10^4 存活細胞)
30	3,001	1	6.65
60	1,183	2	33.82
90	1,152	3	52.68
120	2,298	12	104.4
150	2,497	15	120.2
180	3,775	24	127.2
240	1,744	3	34.4

表 2 紫外线诱发日本裂殖酵母菌生化变株的营养测定

紫外线剂量(秒)	酪素水解液*	核酸水解液*	B 族維生素	需要其他生长因素的菌株**
30	1	0	0	0
60	1	1	0	0
90	0	1	2	0
120	2	1	2	7
150	3	2	5	5
180	3	4	1	16
240	0	0	1	2
总 計	10	9	11	30

* 酪素水解液是按 Snell 法水解。核酸水解液按 Pontecorvo 所介绍的方法。

** 需要其他生长因素菌株: 在基础培养基中, 加入上述三类生长因素不能生长者。

质、維生素及氨基酸等物質。引起另一部分的細胞代謝旺盛, 生长加速^[11,12,17]。紫外线引起这种生物学效应在日本裂殖酵母菌中亦观察到。我們又发现照射后的菌液涂布在麦芽汁洋菜平板上, 所形成的菌落大小悬殊很大。将大小菌落分別挑出, 純化后进行鏡檢。发现有的菌株細胞变大, 子囊孢子也較原始菌株为大(图版 I), 但是营养要求与野生型相同。用蔡司显微操作器将大的及小的子囊孢子分別分离, 培养在微滴中連續觀察。由大的子囊孢子形成的細胞, 可不經結合而直接形成所謂“单性生殖”子囊^[1](图版 II), 其中含有 4—8 个小的子囊孢子, 有时只有一个大的子囊孢子(图版 I)。在个别情况下, 能看到“单性生殖”子囊中含有 8 个以上小的子囊孢子(图版 II)。若将这些小的子囊孢子再进行分离, 則能正常結合, 形成子囊。因此, 由大的子囊孢子形成的細胞为二倍体, 由小的子囊孢子形成的細胞为单元体。所以原来的子囊为四倍体或二倍体。这种現象也在粟酒裂

1) “Parthenogenetic” asci 为 Leupold 首先应用在粟酒裂殖酵母多倍体研究中, 意指細胞不經結合而直接形成子囊孢子。其实就是双倍体营养細胞直接形成子囊。故为研究裂殖酵母多倍体的最好的标记^[20]。

殖酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中发现^[2,22]。紫外綫不同剂量对日本裂殖酵母菌分裂过程的影响列于表 3。

表 3 紫外綫不同剂量对 SJ-20 菌株有性过程的影响

紫外綫剂量 (秒)	观察总菌数	刺激子囊孢子形成		抑制子囊孢子形成		染色体量变	
		菌株数	%	菌株数	%	菌株数	%
30	90	10	11.1	0	0	0	0
60	96	15	15.6	0	0	3	3.1
90	100	21	21.0	2	2.0	9	9.0
120	98	35	35.7	4	4.1	34	34.4
150	97	44	45.7	5	5.2	39	41.4
180	168	33	19.5	8	4.7	12	7.1
240	129	5	3.8	6	4.6	1	0.7

关于八孢子裂殖酵母的生活史有两种意见。Guilliermond^[16]、方心芳^[1]、Lodder 等^[24]都认为裂殖酵母的子囊孢子萌发形成单元体细胞，细胞间结合形成二倍体期的结合子，随后又立即进行减数分裂，形成 8 个子囊孢子。Lindegren^[23]持相反意见。认为子囊孢子结合后形成二倍体细胞，接着进行营养繁殖。也就是说营养细胞主要为二倍体期，单元体期只限于子囊孢子阶段。住口等^[3]证明 Guilliermond 学派的意见是正确的。Suminac 等^[28]详细研究了裂殖酵母生活史指出：不管细胞与细胞间、子囊孢子与子囊孢子间、或者子囊孢子与细胞间的结合以后，一般进行减数分裂，形成子囊孢子。间有例外，细胞间结合后的二倍体细胞先分裂为两个二倍体细胞，再形成子囊孢子。我们也发现这种现象(图版 II)。同时，在 120-10 号变株的菌丝体中观察到一个二倍体细胞形成 8 个小的子囊孢子，而其他的细胞则进行无性繁殖

(图版 II)，构成其无性繁殖的一个部分。子囊孢子的突起(Protuberance)亦看到(图版 II)。这些实验结果指出，八孢裂殖酵母的营养细胞为单元体，一经结合形成二倍体期子囊后，立即进行减数分裂，形成子囊孢子。如同 Guilliermond 学派所指出的那样。但由于某种因素的影响，也会诱发多倍体的形成。已形成的多倍体也能继续繁殖下去，构成生活史中的一部分。多倍体在麦芽汁中常常有恢复到单元体细胞

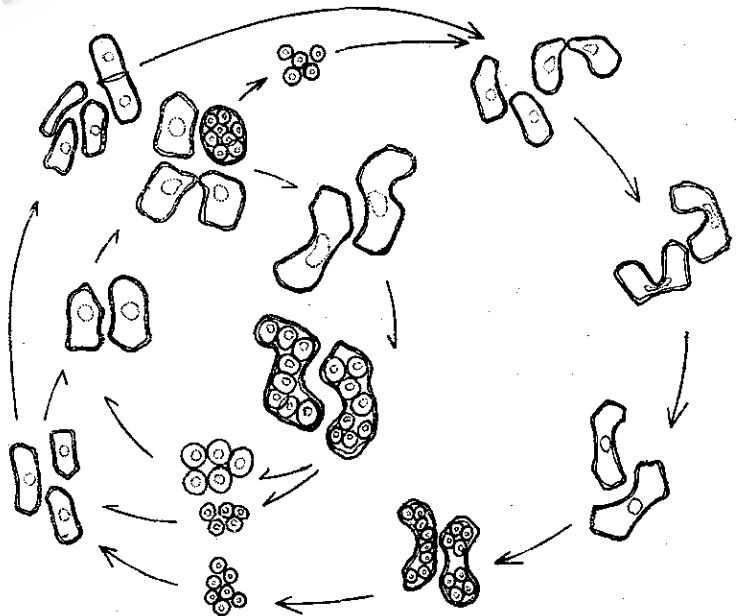


图 3 日本裂殖酵母菌的生活史

元体细胞的趋势。Lindegren^[23]的实验材料可能是单元体与二倍体的混合物(书中只附有

生活史图,未見到实验材料)。八孢裂殖酵母属的营养細胞为二倍体时,就能直接形成子囊孢子,即所謂“单性生殖”子囊。所以,根据我們的实验材料,日本裂殖酵母菌的生活史可归納如图 3。

四、紫外綫誘发細胞形态和細胞特性的变异

酵母菌鉴定书中描述日本裂殖酵母在麦芽汁洋菜培养基上,細胞为圓形、卵圓形及柱状,其寬度变化不大,长度变化很大。故又名易变裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces versatilis*)^[6,24]。在用夹层法挑出的菌株中,鏡检时發現有的菌株細胞形态引起很大的变异,并在紫外綫照射 180—240 秒时出現最多。对一些菌株进行单細胞分离,观察到这种形态变异在某些菌株的后代中能稳定地遺传下去,另一些菌株則不能遺传。如有的菌株变异后,細胞为圓形、梨形、柠檬形以及菌絲状等(图版 III)。这些菌株的細胞形态变异都是可以遺传的。在鏡检过程中,我們沒有看到細胞中液泡明显的收縮現象^[9,30]。这可能与所用实验菌株不同有关。

菌落結構也观察到发生变异。有的菌落結構松软,营养菌絲不再深入到培养基內,細胞为圓形,极易用接种針挑起。相反,有一株菌的营养細胞深入培养基內,細胞为菌絲体状,很难用接种針挑起。同时,也有中間类型的出現。

結 論

1. 紫外綫引起日本裂殖酵母靜息单元体細胞的存活曲綫为对数曲綫,但在高剂量时,存活曲綫出現“拖尾”現象。
2. 紫外綫引起的生化变株的突变頻率呈 S 型曲綫,高剂量条件下,曲綫迅速下降。
3. 紫外綫对日本裂殖酵母的有性过程有刺激和抑制作用两个方面;同时誘发細胞多倍体化,且能正常地繁殖下去,构成其生活史的一个組成部分。
4. 紫外綫引起日本裂殖酵母菌細胞的形态和菌落特征的变异。在这些形态变株中,大多数可以通过有性过程遺传下去,有的則不能。有两株变株的菌落結構也发生变异。

参 考 文 献

- [1] 方心芳: 黄海, 2: 35—62, 1940.
- [2] 蔡金科、唐国敏: 亚硝酸对粟酒裂殖酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*) 的誘变效应。微生物学报, 10: 477—487, 1964.
- [3] 住口金之、三浦二郎: 农化, 33: 468, 1959.
- [4] Корогодин, В. И., Билуши, В., Маркова, Л. И. и Шехтман, Я. А.: Радиобиол., 3:39—44, 1963.
- [5] Косиков, К. В.: Генетика дрожжей и методы селекции дрожжевых культур, Из-во АН СССР, Москва, 1954.
- [6] Кудряцев, В. Н.: Систематика дрожжей, Из-во АН СССР, Москва, 1954.
- [7] Мейсель, М. Н.: Докл. советский делегации на международной конференций по мирному использованию атомном энергий, 78, 1955.
- [8] Миндлин, С. З.: 电离輻射与遺传, 196—222頁, 上海科技出版社, 1961.
- [9] Надсон, Г. А. и Штерн, Е. А.: Докл. АН СССР, А 39—44, 1931.
- [10] Одинцова, Е. Н.: Микробиологические методы определения витаминов, Из-во АН СССР, Москва, 1959.
- [11] Ремизова, Т. С. и Третьякова, В. П.: Журнал общей биологии, 22: 120—127, 1961.
- [12] Adelstein, S. J., Hershey, F. B., Loofbouro, J. R. and Sizer, I. W.: J. Cell. Physiol., 40:269—278, 1952.
- [13] Beam, C. A., Mortimer, R. K., Wolfe, R. G. and Tobias, C. A.: Arch. Biochem. Biophys., 49:

- 110—122, 1954.
- [14] Caldas, L. R., Constantin, T.: *C. R. Acad. Sci.*, **232**:2356—2358, 1951.
- [15] Delong, R. and Lindegren, C. C.: *Bacteriol. Proc.*, **61**, 1951.
- [16] Guilliermond, A.: *The Yeasts*, New York, 1920.
- [17] Hevesy, G. and Zerahn, K.: *Acta Radiol.*, **27**:316—327, 1946.
- [18] James, A. P. and Müller, I.: *Radiation Research*, **14**:779—788, 1961.
- [19] Lacassagne, A.: *C. R. Acad. Sci.*, **190**:524—530, 1930.
- [20] Latarjet, R. and Ephrussi, B.: *C. R. Acad. Sci.*, **229**:306—308, 1949.
- [21] Lederberg, J. and Tatum, E. L.: *J. Biol. Chem.*, **165**:381—382, 1946.
- [22] Leupold, U.: *Compt. rend. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol.*, **26**:273—284, 1956.
- [23] Lindegren, C. C.: *The Yeast Cell, Its Genetics and Cytology*, St. Louis, 1949.
- [24] Lodder, J. and Kreger-van Rij.: *The Yeasts*, Amsterdam, 1952.
- [25] Mortimer, R. K.: *Radiation Research*, **9**:312—326, 1958.
- [26] Pomper, S. and Atwood, K. C.: *Radiation Biology*, **11**:431—453, 1955.
- [27] Sarachek, A. and Luche, W. H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **44**:271—279, 1953.
- [28] Suminae, K. and Dukmo, H.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **9**:242—247, 1963.
- [29] Svihla, G., Schlenk, F. and Dainko, J. L.: *Radiation Research*, **13**:879—891, 1960.
- [30] Townsend, R. and Sarachek, A.: *Jour. Bact.*, **65**:747—749, 1953.
- [31] Warshaw, S. D.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **79**:268—271, 1952.
- [32] Wood, T. H.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **84**:446—452, 1953.
- [33] Wyckoff, R. and Luyet B. J.: *Radiology*, **17**:1171—1175, 1931—32.
- [34] Zirkle, R. E. and Tobias, C. A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **47**:282—306, 1953.

РАДИАЦИОННЫЙ ЭФФЕКТ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧЕЙ НА КЛЕТКИ ДРОЖЖЕВОГО ГРИБА *SCHIZOSACCHAROMYCES JAPONICUS*

Цай Цзинь-ко и Мэнь Да-пун

(Институт микробиологии АН Китая, Пекин)

1. Установлено, что кривая выживаемости клеток *Schizosaccharomyces japonicus* от дозы ультрафиолетовых лучей (уф) показывается в виде логарифмной формы.
2. Частота биохимических мутаций нелинейно возрастает с дозой облучения уф. При дальнейшем повышении дозы количество образующихся мутантов уменьшается.
3. Показано, что уф имеют способность стимулировать и тормозить половые размножения (спорообразование) *S. japonicus*. Выявлено значительное количество полиплоидных вариантов, которые нормально размножаются. На основании полученных результатов следует полагать, что диплоидные клетки *S. japonicus* входят в состав их цикла развития.
4. Были получены морфологически измененные варианты, которые по своим морфологическим особенностям резко отличались от исходной культуры. Подавляющее большинство вариантов устойчиво наследуются при половом размножении.

Структура гигантских колоний у двух вариантов изменялась.