

用秋水仙碱诱发的金霉菌异型细胞质基因突变型研究

刘 颐 屏

(上海第三制药厂抗菌素研究所, 上海)

经 绛 仙

(四川抗菌素工业研究所, 成都)

构巢霉菌 (*Aspergillus nidulans*) 的异型细胞质基因突变, 具有在无性繁殖中表现持久的分离现象、不能获得纯系的突变型菌株以及异核体分离子的异型细胞质基因的表现基本上不受核的影响等的遗传特征。

金霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*) 经秋水仙碱处理后, 也发现类似构巢霉菌的异型细胞质基因突变现象。每一个突变型的菌落在生长过程都发生形态上的分离现象, 能产生两个或两个以上的正常型角变。突变型菌落中央部分的分生孢子具有持久性的形态上的分离现象, 即它所形成的菌落永远是突变型的菌落。但角变部分的分生孢子所形成的菌落都是正常型菌落。

异核体试验结果, 发现含正常型核的异核体分离分子所形成的菌落属正常型, 不发生持久分离现象。另一种不稳定的分离分子, 也不发生持久分离现象, 但可从它所形成的菌落里检出能发生持久分离的分离分子。

用紫外光照射突变型结果, 发现突变型对紫外光的敏感性低于正常型的原始菌株。从它的致死曲线的形状看来, 突变型不似二倍体或双核的细胞。

用紫外光或吡啶黄诱发构巢霉菌异型细胞质基因突变和它的遗传规律研究, 不久前已有报道^[1-5]。但放线菌的异型细胞质基因突变还没见报道。本文叙述用秋水仙碱诱发金霉菌后, 也发现异型细胞质基因突变, 并对突变型的培养特征和突变基因的遗传现象作了观察。结果证实, 放线菌的异型细胞质基因突变, 具有与构巢霉菌基本上相同的遗传规律。

材 料 与 方 法

(一) 菌种

原始菌种金霉菌 P84N-1Y 是金霉素高产量变种 2u-84^[6] 经自然分离而获得的半胱氨酸营养缺陷型。分生孢子鼠灰色, 营养菌丝黄褐色, 可溶性色素深褐色。菌落圆形, 边缘整齐, 表面平

坦。摇瓶发酵的金霉素产量约 6000 毫克/毫升。

(二) 培养基和培养条件

试验过程所用的培养基和培养条件, 除另有说明外, 都与过去报道的相同^[7]。

(三) 秋水仙碱处理

将 P84-N1Y 的分生孢子接种在含有 0.2% 秋水仙碱(法国 UCLAF 牌, 上海试剂厂分装, 批号 59-08-01) 的完全培养基斜面, 在 37℃ 培养两周左右。待新的分生孢子形成后, 即用白金耳将分生孢子轻轻刮下, 用蒸馏水制成单孢子悬浮液。

本文于 1978 年 11 月 28 日收到。

注: 本文于 1965 年在上海医药工业研究院抗菌素研究室完成, 工作过程和稿成后, 承复旦大学遗传研究所盛祖嘉副教授提供不少宝贵意见和审阅, 特此致谢。

参加部分工作的还有: 王惠贞(现在上海医药工业研究院抗菌素研究室) 和许美云(现在成都, 四川抗菌素工业研究所) 两位同志。

经适当稀释后，分离在不含秋水仙碱的完全培养基平板上，在 37℃ 培养一周左右，观察菌落的类型。

(四) 突变型培养特征观察

分别观察分生孢子和菌落的形态以及抗菌素的产量。

(五) 突变型遗传特性的分析

观察持久分离现象，测定异核体分离作用和辐射致死曲线。

结 果 与 讨 论

(一) 突变型的诱发

1. 秋水仙碱的诱变效应：在含有 0.2% 秋水仙碱的完全培养基斜面上长成的分生孢子，分离在不含秋水仙碱的完全培养基平板上，发现有一种比正常型菌落生长缓慢和较小的菌落，频率达 7—12%。当培养至第三天时，这种菌落的中央部分隆起，表面皱折，边缘产生外貌与正常型菌落相似的角变。但是用紫外光、氮芥和吡啶黄处理同一菌株结果，都没有出现这种菌落(表 1)。以后的试验证明，这种菌落是异型细胞质基因突变型。

表 1 几种诱变因素对异型细胞质基因的诱变效应

| 诱变因素 | 剂 量 | 观察菌落 | 正常型 | 异型细胞质基因突变型 | 其他形态突变型 |
|-------------|------------|------|-----|------------|---------|
| 秋水仙碱 | 0.2% | 615 | 198 | 67 | 350 |
| 紫 外 光 | 30 厘米/分钟 | 172 | 169 | 0 | 3 |
| | 2 | 270 | 268 | 0 | 2 |
| | 3 | 409 | 398 | 0 | 11 |
| 氮 芥 | 1 毫克/毫升/小时 | 421 | 390 | 0 | 31 |
| | 2 | 88 | 77 | 0 | 11 |
| | 3 | 46 | 42 | 0 | 4 |
| 吡 啶 黄 | 10r/毫升 | 530 | 530 | 0 | 0 |
| | 50r/毫升 | 239 | 211 | 0 | 28 |
| 自然分离 | — | 600 | 600 | 0 | 0 |

从表 1 结果可清楚地看出，秋水仙碱对诱发金霉菌的异型细胞质基因突变，具有特殊的效果。吡啶黄虽能诱发酵母和霉菌的细胞质基因突变，但是用金霉菌试验结果，没有得到同样的效果。

2. 自发突变的排除：从表 1 结果还可看出，在自然分离的对照组中，未出现异型细胞质基因突变型，因此突变型的发生并非自发突变，而是秋水仙碱处理所引起的。

3. 秋水仙碱选择作用的排除：将在秋水仙碱斜面上长成的分生孢子(包括异型细胞质基因突变型的分生孢子)，移植至另一秋水仙碱斜面，待新的分生孢子形成后，再移植至另一秋水仙碱斜面，如此连续移植至第五次时，斜面上只能生长营养菌丝。这一现象说明由秋水仙碱诱发的异型细胞质基因突变型，对秋水仙碱并没有抗性，因此在秋水仙碱培养基上出现异型细胞质基因突变并非秋水仙碱的选择作用所致。从表 1 结果还可看出，如秋水仙碱有选择作用，则自然分离中亦应该有突变型，同样，紫外光处理结果也应该得到突变型，因为突变型对紫外光具有较强的抗性。

(二) 突变型的培养特征

1. 形态特征：异型细胞质基因突变型的形态特征突出表现在分生孢子的形态和菌落的形成过程。

从突变型菌落中央凸起部分取的分生孢子，具有三种大小和形状不同的类型(图版 I-1_a、1_b)。但当孢子萌发时，只见到一种大型的孢子能产生芽管。在同一个孢子上萌发的芽管数最多的为 5 个，少的也有 3、4 个。原始菌株的孢子只有一种类型，发芽孢子的芽管数一般只有 1 个，最多的也不超过 2 个(图版 I-2_a、2_b)。从突变型菌落的角变部分采取的分生孢子与原始菌株的完全相似。突变型中央部分的分生孢

子在形态上虽有三种类型,但平板分离所形成的菌落只有突变型一种。角变部分的分生孢子分离结果,只有一种正常型的菌落类型。

异型细胞质基因突变型的菌落形成过程,较原始菌株略为缓慢且较小,但当角变产生后,整个菌落的生长速度又与正常型相似。平板培养三天左右的突变型菌落,凸出在培养基表面,菌膜皱折,边缘不整齐,气生菌丝开始形成。五天左右,每个菌落边缘的营养菌丝产生角变,数目自 2、3 个至 5、6 个不等,迅速向外生长,并产生气生菌丝和分生孢子(图版 1-3_a、3_b、3_c)。

突变型菌落的最主要的形态特征是百分之百的菌落都能产生角变。当突变型菌落的营养要求、分生孢子颜色、可溶性色素和抗菌素产量进一步发生突变后,产生角变的特性仍保持不变。可见,发生角变的遗传控制与以上这些特性的遗传控制无关。

2. 抗菌素产量: 突变型菌落的中央部分和角变部分的分生孢子分别移植至孢子

培养基斜面后,在 37℃ 培养 7 天,与原始菌株斜面一起进行摇瓶发酵试验,结果如表 2 所示。

从表 2 可看出,突变型和角变部分的金霉素生物合成能力与原始菌株差异不大,异型细胞质基因突变对金霉素的生物合成无显著影响。

(三) 突变型的遗传特性

1. 持久分离现象观察: 将突变型菌落的中央部分和角变部分的分生孢子分别进行平板分离培养,发现中央部分的分生孢子所形成的菌落全部为突变型,没有一个正常型;而角变部分的分生孢子所形成的菌落,则全部为正常型而没有一个突变型。突变型菌落的中央部分连续四代平板分离结果,突变型菌落始终保持百分之百都能产生角变的这个特征(表 3 和图 1)。可以设想突变型菌落是一种细胞质基因突变的

表 3 突变型和正常型的分生孢子连续四代平板分离结果

| 菌株 | 代数 | 观察菌落 | 突变型 | 正常型 | 其它类型 |
|-----|----|------|-----|-----|------|
| 突变型 | 1 | 377 | 377 | 0 | 0 |
| | 2 | 153 | 153 | 0 | 0 |
| | 3 | 306 | 306 | 0 | 0 |
| | 4 | 118 | 118 | 0 | 0 |
| 正常型 | 1 | 370 | 0 | 370 | 0 |
| | 2 | 307 | 0 | 307 | 0 |
| | 3 | 141 | 0 | 141 | 0 |
| | 4 | 607 | 0 | 607 | 0 |

表 2 突变型和原始菌株的金霉素产量比较

| 菌株 | 金霉素(毫克/毫升)* |
|---------|-------------|
| 突变型中央部分 | 5680 |
| 突变型角变部分 | 5760 |
| 原始菌株 | 5830 |

* 金霉素效价系两次试验 12 个摇瓶发酵的平均值。

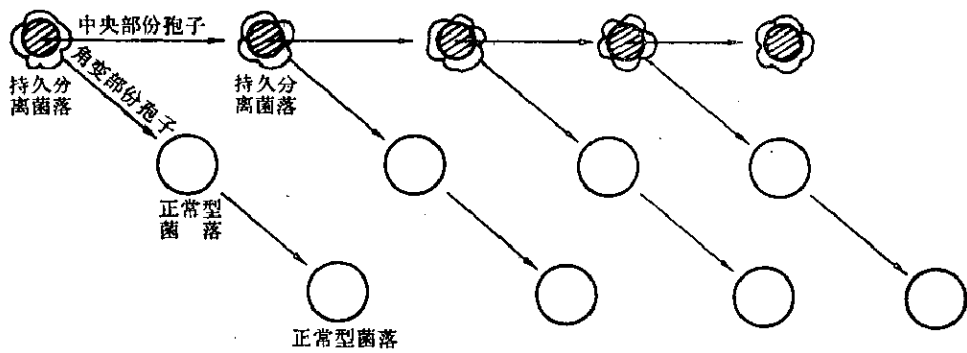


图 1 异型细胞质基因突变型的持久分离图解

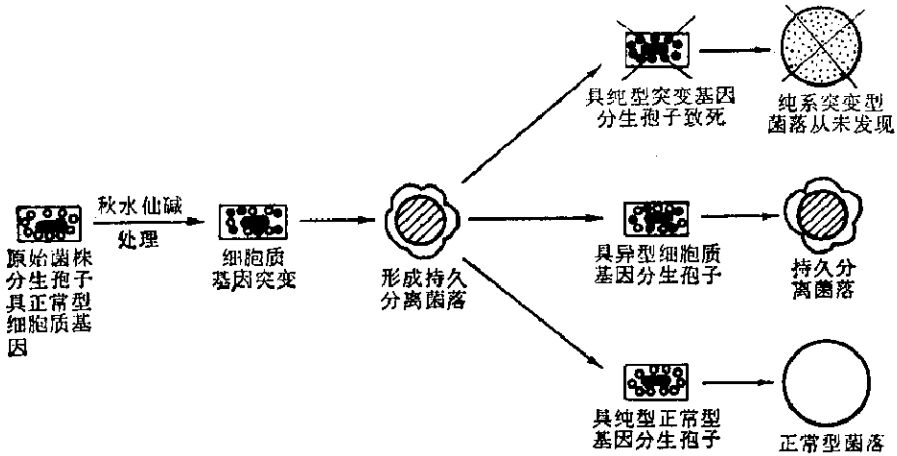


图2 设想中的异型细胞质基因的发生和分离的图解

结果, 因而它能持久地产生两类具有不同遗传性状的分生孢子, 一类是含有异型细胞质基因的, 另一类只含有正常型细胞质基因。按理, 异型细胞质基因突变型分离结果, 能产生三类分生孢子, 即异型、正常型和纯系突变型(图2), 但是连续四代分离结果, 没有发现纯系突变型。因此, 纯系突变型的分生孢子是否存在, 是否具有致死作用, 或是否具有迅速回复突变作用, 都是值得进一步探讨的问题。

从图版 I-3_a、3_b、3_c 的突变型菌落的形成过程来看, 是在培养基内的营养菌丝生长到一定阶段的时候发生分离现象。但是突变型菌落中央部分的营养菌丝生长过程则始终不发生分离现象, 因为从中央部分来的分生孢子从不形成正常型的菌落。

从上述这些现象看来, 异型细胞质基因存在于突变型菌落中央部分的每一个分生孢子中, 因此当孢子形成菌落过程, 都能产生具有生活力的突变型和正常型两类分生孢子。至于正常型角变的产生, 很可能是个别突变型细胞在分裂过程突变基因没有分配到子细胞的缘故。这一不带有突变基因的子细胞繁殖的结果, 形成了一个纯系的正常型角变。这种现象也可能证明在异型细胞质基因突变型的细胞质里含有一

套突变型和一套正常型的细胞质基因。

2. 异核体试验: 两株异型细胞质基因突变型, 一株产生黄褐色色素 (P84N-1C4My), 一株不产生黄褐色色素 (P84N-1C4Mw) 都是半胱氨酸缺陷型, 分别与正常型的精氨酸缺陷型 (N₃u-3) (孢子灰白色, 不产生可溶性色素), 在基本培养基平板上, 用分生孢子混合培养的方法形成了异核体, 并将异核体的分生孢子在完全培养基平板上分离培养, 观察异核体所产生的分离子的遗传性状。

试验结果如表4所示, 在两组配对菌株所产生的异核体菌落中, 各分析了三个, 这些菌落除产生原来配对的两种菌落类型的分离子外, 还产生具有两亲株的形态特征的中间型菌落。

中间型菌落的中央部分凸起, 孢子鼠灰色, 像异型细胞质基因突变型亲株 P84N-1C4My (或 P84N-1C4Mw), 边缘平坦, 孢子灰白色, 无可溶性色素, 象正常型亲株 N₃u-3 (图版 I-4)。中间型菌落的分生孢子分离结果所得的突变型分离子和正常型分离子除了都表现出各自原来的营养缺陷外, 尚有次级中间型菌落出现。看来中间型菌落是种不稳定的菌落, 有继续分离的趋势。但在中间型菌落中, 异型细胞

表 4 异核体菌落的分离现象

| 配 对 菌 株 | 异核体菌落编号 | 观察分离菌落数目 | 突变型菌落 | 正常型菌落 | 中间型菌落 |
|---------------------------------------|---------|----------|-------|-------|-------|
| P84N-1C4My(cys ⁻) | 1 | 467 | 464 | 2 | 1 |
| × | 2 | 428 | 354 | 46 | 28 |
| N ₃ u-3(arg ⁻) | 3 | 526 | 98 | 416 | 12 |
| P84N-1C4Mw(cys ⁻) | 1 | 506 | 475 | 124 | 7 |
| × | 2 | 598 | 545 | 48 | 5 |
| N ₃ u-3(arg ⁻) | 3 | 314 | 163 | 151 | 14 |

质基因不能表现它原有的特征——产生角变的表型。这一现象说明突变细胞质基因的表型,受到了影响。

已知在构巢霉菌中异型细胞质基因突变型与其他正常型菌株形成异核体后,有两种分离现象,一种分离子没有特殊的核质关系,含正常型核的分离子,也具有异型细胞质突变型的表型;另一种分离子的异型细胞质基因突变的表现和保持,必须有原来核的存在,否则如正常型的核基因对异型细胞质基因有抑制作用,则不可能得到含正常型核的异型细胞质基因突变型。

金霉菌的异型细胞质基因突变型的异核体试验结果说明:分离子含正常型的核表现正常型的菌落形态,不产生角变,类似上述第二种分离现象,即异型细胞质基因与核之间有特殊的核质关系。但金霉菌的异型细胞质基因突变型能与正常型形成不稳定的中间型菌落。这一点与构巢霉菌的突变型有所不同。

3. 辐射致死曲线测定:异型细胞质基因突变型和它的原始菌株分别经各种剂量的紫外光照射后,发现异型细胞质基因突变型对紫外光的抵抗能力远远超过原始菌株(图 3)。

从致死曲线的形状来看,都属于单击式,因此异型细胞质基因突变型不像二倍体或具有双核的细胞,可以推想突变型对紫外光抗性的增强,可能是细胞质里存在突变基因的结果。

参 考 文 献

[1] Arlett, C. F. and M. Grindie et al.: *Heredity*, 17:197—209, 1962.
[2] Faluk, B. M. and C. F. Arlett: *Heredity*, 19:63—74, 1964.
[3] Grindie, M.: *Heredity*, 19:75—95, 1964.
[4] Arlett, C. F.: *Nature*, 179:(4572), 1250—1251, 1957.
[5] Jinks, J. L.: *Proc. Roy. Soc. B.*, 148: 314—321, 1958.
[6] 刘颐屏等:第三次全国抗菌素学术会议论文摘要汇编,1964年,第88页。
[7] 刘颐屏等:《抗菌素研究 II》,上海科学技术出版社,1963年,第69页。

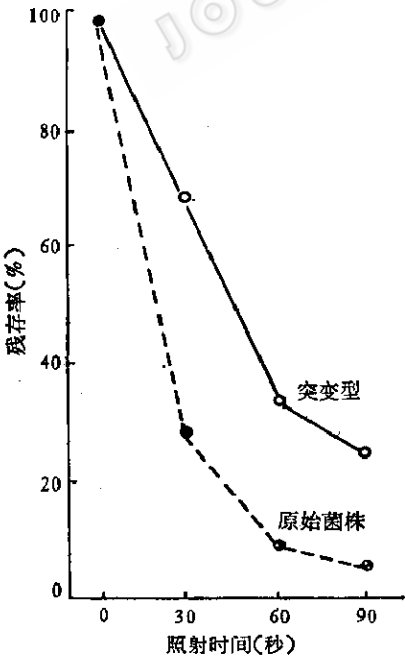


图 3 异型细胞质基因突变型的紫外光照射致死曲线

STUDIES ON A HETEROPLASMIC MUTANT OF *STREPTOMYCES AUREOFACIENS* INDUCED BY COLCHICINE

Liu Yi-ping

(*Institute of Antibiotics Research, The Third Pharmaceutical Plant, Shanghai*)

Jing Jiang-xian

(*Institute of Sichuan Antibiotics Industrial Research, Chengdu*)

1. In comparing the mutagenic effect of colchicine with that of ultraviolet, nitrogen mustard and acriflavine for inducing heteroplasmic mutation, only colchicine yields a satisfactory result.

2. The heteroplasmic mutant has larger conidia with more germ tubes during germination than the original strain.

3. In colony formation every colony of the heteroplasmon, showed morphological persistent segregation thus producing two or more normal sectors. Conidia from the central part of the heteroplasmic colony possessing the morphological persistent segregation, form heteroplasmic colonies, while conidia from the normal sectors formed only heteroplasmic normal type colonies. It thus suggests that there are two kinds of cytoplasmic determinants in the heteroplasmic conidia.

4. The non-recovery of a pure-breeding mutant in a heteroplasmic colony further suggests that the mutated gene is due to the lethal in the homoplasmic state.

5. The results of heterocaryon test showed that the segregant with normal nucleus form normal type colony only, it suggests that there is a special nucleocytoplasmic relationship between the mutated cytoplasmic gene and the nucleus. In addition, an unstable merozygote is screened out, the colonial morphology of the merozygote lies between the other two kinds of segregants, without showing any morphological persistent segregation. It further suggests that the phenotype of the mutated gene is inhibited by the normal nucleus in merozygotic state.

6. The effect of the mutant cells under the exposure of ultraviolet radiation showed that it possesses greater resistance than the normal type strain, but the killing curve of the mutant is quite different from that of the diploid or double-nucleus strain, it is therefore concluded that the increasing resistance of the mutant is due to the action of the cytoplasmic gene.