

面包酵母子囊孢子的形成条件及细胞学研究

曾洪梅* 徐浩

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

通过对面包酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 耐干性菌株 X-8 在几种生孢条件下生子囊孢子的研究, 发现菌株 X-8 生孢的最适培养基为 Kleyⁿ 培养基, 最适培养温度为 28℃。在液体中生孢菌体需要大通气量, 其生孢的最佳细胞群体密度为 8.0×10^8 个细胞/ml。同时还发现, 即使在恒温条件下, 菌株 X-8 在秋天较其他季节更易生孢子。在上述条件下, 比较 X-8 和不耐干的 CY26 菌株, 结果菌株 X-8 的生孢能力远远大于菌株 CY26。X-8 的电镜照片显示出生孢过程中子囊内的一系列变化, 即随着生孢时间的增加, 造孢物质逐渐减少, 孢子及孢子壁逐渐完善与成熟。孢内的细胞核在孢子形成的整个过程中一直清晰可见。

关键词 子囊孢子; 孢子形成; 面包酵母

面包酵母 (*S. cerevisiae*) 的孢子形成系指营养细胞经过减数分裂形成子囊孢子的过程。孢子形成是酵母生活中的一个阶段, 这时酵母由二倍体变成单倍体, 从而完成其有性繁殖的准备工作。酵母一般在营养缺乏条件下形成孢子。对酵母生孢这一过程的研究, 国内外均有报道, 但基本上都是对生孢过程的基因调控^[1-4]、酶活性^[5]、糖的吸收活性^[6]及孢子壁特异性组成^[7,8]等方面的研究, 对孢子形成条件及生孢这一动态过程中的细胞学方面的研究反而较少^[9,10]。*S. cerevisiae* 可生成一孢子、二孢子、三孢子及四孢子子囊四种, 用于工业育种及遗传研究四分体分析方面的是四孢子子囊。由于孢子的生活能力、交配活性及杂交成功率等种种因素的影响, 需要分离大量孢子, 倘若不知孢子形成的最适条件, 则很难获得这个数目。因此, 找到培养孢子的最适条件并进一步对生孢的细胞学过程进行系统研究也显得极为重要。为此, 我们选择了面包酵母 X-8 和 CY26 菌株为材料进行此项研究。

材料和方法

(一) 菌种和培养基

1. 菌种: 实验用的酵母 *S. cerevisiae* 菌株 X-8 和 CY26 由本所 708 课题组提供。
2. 培养基: 预孢子形成培养基为 10°Bg 固体麦芽汁培养基或 15°Bg 液体麦芽汁培养基; 孢子形成培养基有 Kleyⁿ 培养基^[11], 浓度分别为 0.1%、0.5%、1%、5% 和 10% 的液体及固体乙酸钠培养基, 胡萝卜块培养基, 以及用生石膏加水做成的熟石膏块培养基。

本文于 1992 年 3 月 18 日收到。

* 现在中国农业科学院植物保护研究所工作。

(二) 染料

铀染液: 2% 乙酸双氧铀水溶液; 铅染液: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1.33g, 柠檬酸钠 1.76g, 水 30ml。

(三) 孢子形成的预培养和培养

先在预孢子形成培养基上培养酵母菌体: 28°C, 24 小时。然后将酵母接种于孢子形成培养基培养, 28°C 5 天, 摇瓶培养 200r/min, 半通气试验采用摇瓶培养与静止培养各 12 小时间隔进行。Carl Zeiss 相差显微镜观察, 血球计数板计数。

(四) 电镜制样及观察

2.5% 戊二醛 -1% KMnO_4 双固定, 乙醇逐级脱水, Epon 812 树脂包埋。然后用 LKB 8800 型超薄切片机切片, 铀-铅双染色, 最后在 Hitachi H-600A 电镜下观察并照相。

结 果

(一) 不同培养基对孢子形成的影响

28°C 时, 选用 Kleyn 和乙酸钠培养基为生孢培养基。实验证明菌株 X-8 在 Kleyn 培养基上生孢率高(达 75%), 产生的四孢子子囊多, 占 7% (图 1)。而在乙酸钠培养基上生成的二孢子子囊多, 四孢子子囊少(只占 3%), 且在显微镜下生孢后期生成的孢子退化者较多, 孢子质量不高。本实验采用的不同浓度乙酸钠培养基的结果为: 浓度 1% 的最好, 生孢率达 76%, 其中四孢子子囊生成率为 3% (图 2); 浓度大于 1% 或小于 0.5% 均不好, 当浓度 10% 时, 菌株 X-8 完全不生孢。用胡萝卜块和石膏块做培养基时, 生孢

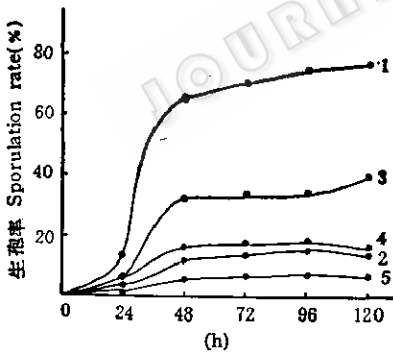


图 1 菌株 X-8 在 Kleyn 培养基上的生孢率

Fig. 1 The sporulation rate of strain X-8 on Kleyn medium

1. 总生孢率 Total sporulation rate;
2. 一孢子生成率 1-spore formation rate;
3. 二孢子生成率 2-spore formation rate;
4. 三孢子生成率 3-spore formation rate;
5. 四孢子生成率 4-spore formation rate.

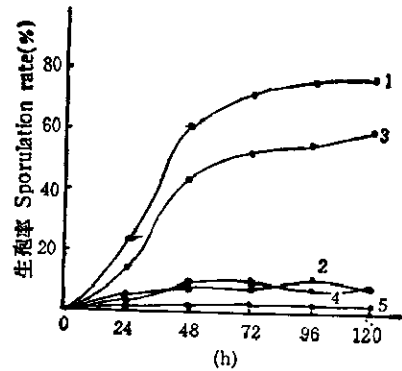


图 2 菌株 X-8 在 1% NaAc 培养基上的生孢率

Fig. 2 The sporulation rate of strain X-8 on 1% NaAc medium

1. 总生孢率 Total sporulation rate;
2. 一孢子生成率 1-spore formation rate;
3. 二孢子生成率 2-spore formation rate;
4. 三孢子生成率 3-spore formation rate;
5. 四孢子生成率 4-spore formation rate.

率也都不高。在石膏块上的总生孢率最大为 41%, 四孢子子囊生成率为 2%。故 Kleyn 培养基为菌株 X-8 的最适生孢培养基。

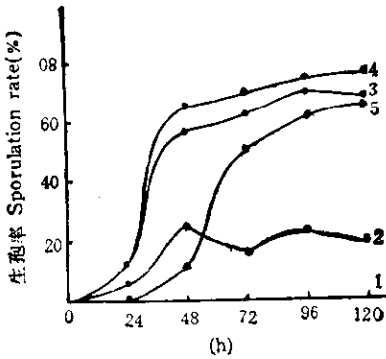


图3 温度对菌株 X-8 孢子形成的影响

Fig. 3 The influence of temperature on sporulation of strain X-8

1. 37°C; 2. 35°C; 3. 32°C; 4. 28°C;
5. 20°C.

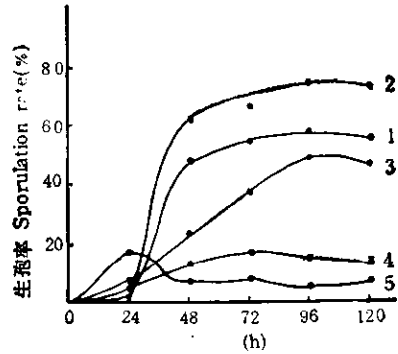


图4 细胞群体密度对菌株 X-8 孢子形成的影响

Fig. 4 The influence of cell population density on sporulation of strain X-8

1. 4.0×10^6 cells/ml; 2. 8.0×10^6 cells/ml;
3. 1.70×10^7 cells/ml; 4. 9.56×10^7 cells/ml;
5. 2.90×10^8 cells/ml.

(二) 影响生孢的几种因素

1. 温度: 温度对菌株 X-8 孢子形成有明显影响。图3表明, 菌株 X-8 在 28°C 时生孢最好, 温度小于 20°C 或大于 32°C 其生孢能力均明显下降, 37°C 时完全不生孢。

2. 细胞群体密度: 28°C 时, 以菌株 X-8 不同细胞群体密度在 Kleyn 培养基中摇瓶培养。实验结果表明, 细胞群体密度以 8.0×10^6 个细胞/ml 左右为最好, 高于或低于它孢子生成率均明显下降(图4)。

3. 通气: 采用 Kleyn 培养基, 细胞浓度为 8.0×10^6 个细胞/ml, 28°C, 200r/min 摇瓶培养, 完全通气时菌株 X-8 生孢率最大, 约达 74%; 完全静止时则不生孢; 在通气与静止各 12 小时间隔进行时生孢率比完全通气时低, 达 43%。另外, 实验结果也证明浅层培养时生孢率也很高。

4. 季节: 菌株 X-8 生孢随季节有明显变化。在春、夏、秋、冬四季, 将 X-8 转入 Kleyn 斜面, 然后放入 4°C 冰箱保存, 结果在秋季第 18 天后发现有孢子出现, 而在其他季节两个月以上均不见有孢子出现。

(三) 耐干性酵母和不耐干性酵母生孢能力的比较

由表 1 可以看到, 耐干性酵母菌株 X-8 和不耐干性酵母菌株 CY26 在 Kleyn 平板上的生孢情况。根据两个样本百分数相比较的假设测验^[12], 比较两者的生孢能力, 得出的 μ 值均大于 4。若显著水平取 $\alpha = 0.01$, 作两尾测验, 则 $\mu_{0.01} = 2.576$, 即 $\mu > \mu_{0.01}$, 说

表 1 菌株 X-8 和 CY26 在 Kleyn 平板上的生孢率

Table 1 Sporulation rate of strain X-8 and CY26 on Kleyn's plate

菌株 Strains	总生孢率 Total sporulation rate(%)				
	24h	48h	72h	96h	120h
X-8	12.46	65.32	69.78	73.13	75.44
CY26	2.95	12.21	17.40	18.36	6.95

明菌株 X-8 的生孢能力和菌株 CY26 的生孢能力有显著差别。同样在 Kleyn 培养基上, X-8 的生孢能力比 CY26 的强。即耐干性酵母生孢率高。

(四) 孢子的电镜观察

上述实验涉及了菌株 X-8 的生孢情况, 我们同时可从超薄切片的电镜照片中观察到生孢酵母细胞内结构的细微变化。图版 I 为菌株 X-8 不同生孢时间的大视野照片。可明显看到, 在 Kleyn 平板上 96 小时的生孢率比 72 小时和 24 小时的均大, 这与图 1 的结果吻合, 证实了前面结论的可靠性。比较菌株 X-8 不同生孢时间的电镜照片(图版 II) 发现, 在孢子形成初期, 孢子壁和子囊壁间有相当多的造孢剩质 (epiplasm), 包括线粒体、脂质、糖原及一个或多个未形成孢子的核^[4], 随着生孢时间的增加, 胞内造孢剩质逐渐减少, 而孢子和孢子壁却日趋成熟, 孢子壁从发育不完全、壁薄、形状不固定直至发育完好, 呈双层膜结构。在孢子形成后至成熟的整个过程中, 孢子的细胞核都清楚可见。

讨 论

孢子形成是由预孢子形成和孢子形成两个阶段的因素所控制。除孢子形成期需要营养缺乏的条件外, 应在预孢子形成期和孢子形成期使用合适菌龄的细胞, 提供适当的氧和温度, 并应调节细胞群体密度等条件以促进孢子形成。饥饿是孢子形成的必不可少的条件, 同时, 少量可利用的糖类和有机酸盐也是 *S. cerevisiae* 最适生孢所必需的。生孢是一个耗能过程, 完全提供非发酵性碳源则能量供应不足, 使减数分裂过程中着丝点、纺锤体及纺锤体极体等不能正常行使其功能, 导致减数分裂失败, 从而形成少于四孢子的子囊或完全不生孢。而提供适量的发酵性碳源, 如葡萄糖, 则既提供了足量孢子形成的碳骨架和其他前体, 又提供了孢子形成必需的能量, 有利于孢子形成。Katohda^[6] 和 Briza^[7] 从孢子壁的特异组成上也证实了这一点。因此, 在生孢过程中需同时有适量的能源及碳源。实验的结果 Kleyn 培养基是菌株 X-8 的最适生孢培养基也同此观点相符合。

对 *S. cerevisiae* 的孢子形成, 公认为单孢子子囊的产生是由于减数分裂产生的四个子核中只有一个成功地发育为孢子, 其余三个因发育障碍而未能形成孢子, 二孢子、三孢子子囊的产生则可类推。只有四孢子子囊的产生才是四个子核全部都成功地发育为四个孢子。尽管大都如此认为, 但生孢失败子核的退行性变化却无人清楚地观察过。本文图版显示的结果也是如此。生成的孢子中细胞核都清楚可见, 在造孢剩质中虽然可见线粒体等细胞器, 却不见有生孢失败的子核。可能此子核被胞内酶水解了, 也可能相片上未显示出来。这方面未见有任何报道。造孢剩质被部分降解后用于外层孢子壁的形成及构建孢子内储存物质, 表现为胞内造孢剩质随着孢子的成熟而逐渐减少。生孢是在饥饿条件下进行的, 子囊从外界吸入的营养不多, 却要在其中形成孢子。所以, 孢子形成主要是靠胞内物质的重新组装利用而得以实现的。这样, 自然的结果是四孢子子囊内的造孢剩质少于非四孢子子囊内的造孢剩质。造成图版中非四孢子子囊的原因可能是生孢失败或孢子退化, 也可能是四个孢子不在同一平面, 切片上不能同时展现四个孢子。另外发现有的细胞可以同时出芽和生孢(图版 II-4), 而有的细胞不仅同时出芽和生孢, 且芽细胞在脱离母细胞之前也同样生孢了(图版 I-3)。这是酵母在转入生孢培养基后不久个别细胞靠胞内自身贮存的糖源和生孢培养基中少量的糖得以出芽, 但芽细胞在未脱离母体时整

个细胞便进入了生孢状态。这种情况很少出现。

KMnO₄ 是一种强氧化剂,对磷脂蛋白有特别良好的固定作用,可用于保护细胞的膜性结构^[1]。图版 I 和 II 中孢子囊壁和孢子壁的膜结构均相当清晰,孢子外壁比孢子囊外壁颜色深,反差大,说明其吸附的重金属锰的成分多,也即孢子外壁含有丰富的表面脂层,这与 Rose^[11] 等人的报道吻合。但生孢仅 24 小时的细胞因其孢子壁还未完全成熟,富脂层未完全形成,孢子壁外层不比孢子囊壁外层反差大。

关于孢子形成的影响因素,固体培养时温度是主要的,可能同与生孢有关的酶的作用有关;液体培养时细胞群体密度及通气量也影响生孢,孢子形成时细胞浓度不能过高并且需要足量通气,说明氧气混合物对保证生孢是必需的。另外,季节也与孢子形成有关,在秋季最容易生孢。这种现象的原因不明,有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Percival-Smith, A. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 6: 2443—2451, 1986.
- [2] Garber, A. T. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 6: 4478—4485, 1986.
- [3] Kurtz, S. et al.: *Yeast Cell Biology: Proceedings* (ed. Hicks, J.), pp. 159—169, Alan R. Liss, Inc., New York, 1986.
- [4] Dickinson, J. R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 134: 2475—2480, 1988.
- [5] Van Ryk, D. I. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 31: 1095—1102, 1985.
- [6] Ota, A.: *Microbios*, 48: 17—26, 1986.
- [7] Briza, P.: *J. Bio. Chem.*, 261: 4288—4294, 1986.
- [8] Katohda, S. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 48: 895—901, 1984.
- [9] 徐志彦等: *微生物学通报*, 14: 151—153, 1987.
- [10] 柳岛直彦等: *酵母の解剖*, pp. 97—105, 東京講談社サイエンティフィック, 1981.
- [11] Rose, A. H. et al.: *The Yeasts*, Vol. I, pp. 303—383, Academic Press London and New York, 1969.
- [12] 南京农学院主编: *田间试验和统计方法*, 第 74—75 页, 农业出版社, 北京, 1978 年。
- [13] 汪德耀主编: *细胞生物学实验指导*, 第 265 页, 高等教育出版社, 北京, 1986 年。

STUDIES ON THE CONDITION AND CYTOLOGY OF ASCOSPORE FORMATION OF BAKER'S YEAST

Zeng Hongmei Xu Hao

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

A drought-resistant strain of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), X-8 was studied under several sporulation conditions. Results showed that the optimum sporulation medium and cultivation temperature were Kleyn medium and 28°C respectively. When cultivated in liquid, the strain sporulated best with the cell population density of 8.0×10^6 cells/ml and intense aeration. X-8 was observed to sporulate easier in fall than in other seasons. When compared with a drought-sensitive strain CY26 of baker's yeast under above conditions, X-8 showed much greater sporulation tendency. The electronic micrographs of X-8 indicated a series of changes in the asci during sporulation, that is, as the sporulation went on, the epiplasm decreased gradually, the spore and spore wall tended to perfect and mature. The nuclear zone in the spore was seen clearly throughout the whole sporulation process. These results elucidated the cytology of sporulation of baker's yeast in dynamic aspect.

Key words Ascospore; Sporulation; Baker's yeast

图 版 说 明

Explanation of plates

图 版 I

X-8 在 Kleyn 培养基上不同生孢时间的大视野电镜照片: 1.24 小时 ($\times 3,500$); 2.72 小时 ($\times 4,000$); 3.96 小时 ($\times 4,000$)。

图 版 II

X-8 在 Kleyn 培养基上不同生孢时间的电镜照片: 1.24 小时 ($\times 12,000$); 2.48 小时 ($\times 8,000$); 3.96 小时 ($\times 12,000$); 4.96 小时 ($\times 6000$)。

Plate I

The large field electronic micrographs of X-8 when sporulated on Kleyn medium in various hours: 1.24h; 2.72h; 3.96h.

Plate II

The micrographs of X-8 when sporulated on Kleyn medium in various hours: 1.24h; 2.48h; 3.96h; 4.96h.