

热带假丝酵母二型性菌体细胞的形态和结构差异*

Differences in Shape and Inner Structure in Dimorphism of *Candida tropicalis*

张晓云 韦一能**
Zhang Xiaoyun Wei Yineng

(广东医学院生物教研室 广东湛江 524023)

(Department of Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong, 524023, China)

摘要 用光学显微镜和电子显微镜研究热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 的二型性。菌丝体 (M) 和单细胞酵母 (Y) 形态差异很大, M 是长管状多细胞相连, Y 则是球形的单个细胞。内部结构上也体现了与其形态的相适应性。M 菌丝顶端大的液泡为菌丝的延伸提供压力, 但当顶端生长芽管时, 大液泡会分裂成小液泡, 部分小液泡进入芽管; 菌丝顶端和侧面的泡囊, 与其顶端生长和侧枝发生有关。单细胞酵母中, 靠近母细胞和子细胞相连的部位, 有些囊泡和颗粒物质, 可能与细胞的新壁形成和分开有关。

关键词 酵母 形态差异 二型性

中图法分类号 Q 936

Abstract The dimorphism of *Candida tropicalis* was studied by means of both optical and electronic microscopes. There is much difference in shape between mycelium and yeast. Mycelium is some tubular cells lined together, while yeast is single-celled. The inner structures of mycelium and yeast are coincided with their shapes respectively. A large vacuole in the apical hypha of mycelium provides pressure for hypha expansion, whereas, the large vacuole was divided into small ones when hypha elongates from mother cell, and some small vacuoles go into the new hyphae. There were many vesicles in the apicula and both sides of hyphae, which are response to apical growth and branching of hyphae. In yeast, some vesicles and particulate matters are found in the juncture between mother cell and daughter cell. They were related to formation of new cell wall and division of mother cell and daughter cell.

Key words *Candida tropicalis*, morphology of cell, dimorphism

Muthukumar 等^[1] 和 韦一能^[2] 相继发现 *Ceratocystis ulmi* 在 GYR 和 GYP (G 为 2% 的葡萄糖, Y 为 0.2% 酵母提取物, R 为精氨酸, P 为脯氨酸) 培养基中细胞形态有异, 而且脯氨酸可使其由多细胞形态向单细胞形态转变, 最佳浓度为 10 mmol/L。另外, 培养温度, 接种量也会对细胞形态产生影响^[3-5]。

菌丝体 (M) 和单细胞酵母 (Y) 形态差异明显, Y 是单细胞形态, M 则是多个细胞相连的丝状体; 内部结构亦有差异, Y 一般以芽殖方式增加细胞个数, 其间液泡和线粒体活动旺盛, M 又可分为假菌丝和菌丝型, 假菌丝是伸长的芽管与母体相连但不分开, 菌丝型细胞间有隔膜, 位于细胞膜处有泡囊, 与细胞膜延伸有关, 还有大量线粒体存在。

本文以热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 为出

发菌, 在 GYR 和 GYP 中培养 (Y 为 0.15% 酵母提取物, 并加入 0.1% K_2HPO_4 , 其余同上), 选出诱发稳定二型性的合适温度和合适接种量, 并对 M 和 Y 的形态结构进行观察, 为进一步揭示二型性的发生机理提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

所用试剂除酵母提取物为进口外, 其它均为国产分析纯。

1.2 材料和方法

1.2.1 材料

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 由广西师范大学生物系微生物教研室提供。菌体培养及菌体提取参照文献 [6]。

1.2.2 方法

1.2.2.1 培养温度和接种量的选择

在 25 ml GYR 和 GYP 中接入适量菌体悬液, 分

2000-09-27 收稿, 2000-12-01 修回。

* 广西回国人员基金资助项目。

** 广西师范大学生物系, 广西桂林, 541004 (Department of Biology, Guangxi Normal University, Guilin, 541004, China)

别在 25°C 和 37°C 下静置培养, 每隔 4 h 镜检 1 次; 然后在 37°C 下分别接入菌体悬液于 25 ml 培养基中, 使其浓度为 8×10^5 个细胞 / 毫升, 5×10^6 个细胞 / 毫升, 10^7 个细胞 / 毫升, 每隔 4 h 镜检 1 次, 选出诱发二型性的合适温度和合适接种量。

1. 2. 2. 2 光镜下观察二型性菌体细胞形态

在 25 ml GYR 和 GYP 中分别接入菌体悬液, 使其浓度为 5×10^6 个细胞 / 毫升, 37°C 下培养, 每隔 4 h 取少量菌体细胞用醋酸洋红染色制片, Olympus BH-2 型光镜下观察形态并拍照, 培养 12 h 时提取菌体备用。

1. 2. 2. 3 扫描和透射电镜下观察二型性菌体细胞结构

培养 12 h 时提取的二型性菌体细胞, 在 1% 高锰酸钾冰浴中固定 30 min, 然后进行乙醇系列脱水, 醋酸异戊酯浸泡以及临界点干燥, 最后喷金用扫描电镜观察^[7]。

用透射电镜观察时的样品处理如下: 细胞置于磷酸缓冲液 (pH 值 7.4) 配制的 0.25 mol/l 半胱氨酸溶液中 15 min ~ 30 min, 用缓冲液洗 2 次, 离心 (此处理为了削弱细胞壁的影响, 促进固定剂的渗透), 6% 戊二醛固定 4 h, 在 40°C 水浴中加入 2% 温热的琼脂, 轻微搅拌, 使之与细胞相凝, 冷后用刀片切成 1 mm² 的小块, 2% 锇酸固定 2 h, 乙醇系列脱水, Epon 812 树脂渗透包埋, 制切片, 铀铅双染色。透射电镜观察^[7]。

2 结果和讨论

2. 1 诱发 *C. tropicalis* 二型性的合适条件和光镜下的细胞形态

观察可见, 在以氨基酸为氮源的情况下, 诱发二型性的合适温度为 37°C, 合适接种量为 5×10^6 个细胞 / 毫升。此条件下, GYR 中细胞培养 12 h 时出现明显的菌丝体 (图 1); GYP 中细胞在培养 8 h 时观察到一些短的丝状体, 但 12 h 时则以单细胞形态为主 (图 2), 说明其形态发生过程中经历一个短暂的丝状体阶段。GYR 和 GYP 中加入了不同的氨基酸作为氮源, GYP 中的脯氨酸对 *C. tropicalis* 二型性的调控可能出现在培养的 8 h 左右。

2. 2 电镜下细胞结构差异

2. 2. 1 扫描电镜下的观察

单细胞形态酵母 (Y) 呈球形或椭圆形, 宽度为 2 μm ~ 3 μm, 长 2 μm ~ 7 μm。Y 细胞以出芽方式增加细胞个数, 从母细胞表面上突起形成一个“小芽”,

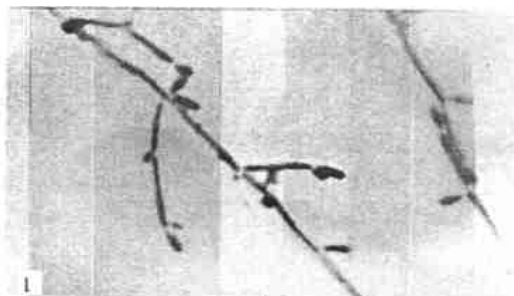


图 1 GYR 中培养 12h 时的菌丝体
Fig. 1 Mycelial after 12 hours in GYR



图 2 GYP 中培养 12h 时的单细胞酵母菌体细胞
Fig. 2 Yeast cell after 12 hours in GYP

细胞表面可以看到芽痕和蒂痕 (图 4); 菌丝体细胞呈管状, 宽 1 μm ~ 2.5 μm, 长 20 μm ~ 60 μm, 菌体细胞有分枝, 细胞间有隔膜, 侧枝都出现在隔膜的附近 (图 3)



图 3 电镜下的菌丝体

Fig. 3 Mycelial observed with electronic microscope



图 4 电镜下的单细胞酵母菌体细胞

Fig. 4 Yeast cell observed with electronic microscope

2. 2. 2 透射电镜下的观察

单细胞酵母细胞内部细胞器很明显, 可辨认的有细胞壁、细胞膜、细胞核、液泡、液泡内的一些颗粒、线粒体, 以及一些贮藏颗粒和囊泡 (图 5); 单细胞形

态以芽殖方式增加细胞个数，顶端突起，形成小芽，然后芽体逐渐伸长，母细胞中核移至母细胞和芽体之间分裂，一个核进入芽体，一个回到母细胞，液泡也由一个分裂成许多小的，部分小液泡进入芽体，线粒体体积增大并分开，部分进入芽体；芽体和母细胞之间在相连的部位有物质堆积（电镜下可见连接处较暗，说明此处电子密度大，有堆积的物质存在），可能发生物质交换，也可能是合成细胞壁的前体物质，当芽体长到一定程度时，两细胞连接处会分别形成新壁（图 6），母细胞表面呈凹形，芽体脱落后形成芽痕，芽体细胞的该部位留下蒂痕，在母细胞的其它部位又可以突起再形成新的芽体；最终两细胞分离，芽体脱离母细胞，那些小液泡在母细胞和子细胞中又重新融合形成大液泡，出芽初期，细胞核凹凸不规则，也

显示了细胞生理活动比较旺盛

多细胞酵母细胞同样可辨认出细胞壁、细胞膜、细胞核、线粒体，菌丝顶端还聚集了泡囊（图 7）；为芽管发生打下基础，芽管自母体长出，细胞核中可以见到两组着色深的部位，可能与遗传物质的分开有关，芽管逐渐伸长但与母体不分开，形成假菌丝（图 8），或者形成有隔膜的菌丝型细胞，隔膜自中心形成，可见中央着色深，隔膜逐渐生长，细胞相连，形成菌丝体，成熟的隔膜是桶形，中央膨大，使隔膜呈中央厚、两边稍薄的桶形，外被一层桶形覆垫（图 9），但隔膜中央无中心孔。同文献 [9] 报道的 *C. albicans* 菌丝体隔膜相似。



图 5 单细胞酵母菌体细胞中的主要细胞器

Fig. 5 The main infrastructures in yeast cell. $\times 30\ 000$

N: 细胞核 Nucleus; V: 液泡 Vacuole; M: 线粒体 Mitochondria.



图 6 单细胞酵母菌母细胞与子细胞

Fig. 6 The mother cell and daughter cell in yeast. $\times 25\ 000$

M: 线粒体 Mitochondria; Bs: 芽痕 Bud mark (泡囊 vesica); bs: 蒂痕 Base mark; N: 细胞核 Nucleous; V: 液泡 Vacuole; Vx: 囊泡 Vesicle.

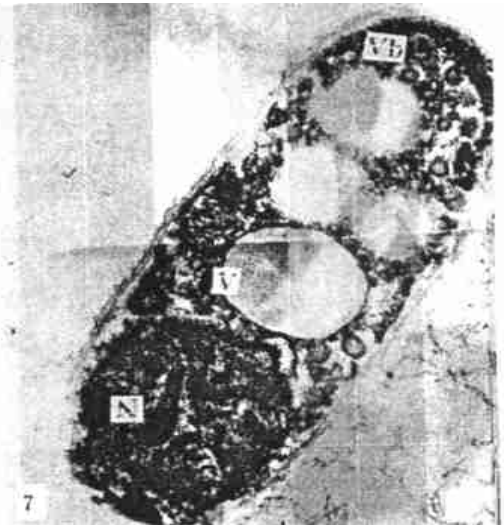


图 7 菌丝体细胞中的主要细胞器

Fig. 7 The main infrastructures in mycelial cell. $\times 40\ 000$

V: 液泡 Vacuole; Vb: 囊泡 Vesicle.



图 8 细胞相连的假菌丝

Fig. 8 Pseudohyphae with cells lined together. $\times 30\ 000$



图 9 菌丝体隔膜的桶形隔膜，外被“桶形覆垫”

Fig. 9 Septum covered with parenthosome in mycelial. $\times 50\ 000$

电镜下 M 和 Y 的超微结构, 显示了其与形态的相适应性。无论 M 还是 Y, 芽体或芽管长出时, 线粒体总是移到母细胞与芽体或芽管相连的部位, 为子细胞的发生提供能量; 液泡在子细胞发生时也会发生形态的变化, 在芽体或芽管发生时, 母细胞中有比较大的液泡, 大液泡逐渐分裂形成小液泡, 部分小液泡进入子细胞, 等到形成子细胞后, 这些小液泡又分别在母细胞和子细胞中聚成大液泡。由于液泡内含有许多酶类, 在诱导 M 和 Y 形成时, 氨基酸可能起作用产生不同的酶参与了生物代谢过程, 从而产生不同的形态。M 和 Y 又各自有和本身形态发生相关的结构。在 Y 中, 靠近母细胞和子细胞相连的部位及靠近子细胞和母细胞相连的部位, 有些颗粒状物质和囊泡, 这些物质与母细胞和子细胞的新壁形成有关, 囊泡中可能含有一种酶, 这种酶与芽体形成区的质膜相融合, 释放水解酶激活细胞质中的几丁质合成酶, 利于新壁的形成, 使细胞分开。在 M 细胞中, 母细胞顶端形成的大液泡 (相对细胞直径来说比较大), 所起的作用是产生压力使菌丝延伸。在 M 细胞的侧壁以及顶端部位有很多泡囊, 着色稍深, 含有多种水解酶类, 顶端泡囊与 M 细胞顶端生长时细胞壁的形成有关, 侧面的泡囊可能与 M 的侧枝发生有关。综上所述, *C. tropicalis* 二型性菌体细胞形态和结构有明显差异, 这些差异与所加氨基酸有何关系, 氨基酸是如何调控二型性发生的, 还需进一步从二型性菌体细胞生物化学差异上来分析。

致谢

本文的细胞形态观察得到广西师范大学分析中心张杏辉老师的大力帮助, 在此表示感谢。

- 1 Muthukumar Ganapathy, Nickerson W. Kenneth. Ca^{2+} -calmodulin regulation of fungal dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. Journal of Bacteriology. 1984, 390~ 392.
- 2 韦一能. 脯氨酸对 *Ceratocystis ulmi* 两种形态的影响. 微生物学通报, 1994, 21 (3).
- 3 Petal Romondini. Superoxide dismutase, catalase and cell dimorphism in *Candida albicans* cells exposed to methanol and different temperatures. Comparative Biochemistry and Physiology C Pharmacology Toxicology and Endocrinology, 1994, 108 (1): 47~ 54.
- 4 John C. Ahrens, Margaret R. Price et al.. Effect of culture density on the kinetics of germ tube formation on *Candida albicans*. J of General Microbiology, 1983, 129 3001~ 3006.
- 5 Rajiv K. Kolkarmi, Nickerson W. Kenneth. Nutritional control of dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. Experimental Mycology, 1981, 5: 148~ 154.
- 6 张晓云, 韦一能. 酵母二型性菌体内 SOD 和 MDH 同工酶的电泳分析. 广西师范大学学报 (自然科学版), 1998, 16 (4): 82~ 84.
- 7 林钧安, 高锦梁, 洪键等. 实用电子显微术. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1989.
- 8 Buchan D B Arleme, Gow A R Neil. Rates of germ tube formation from growing and non-growing yeast cells of *Candida albicans*. FEMS Microbiology Letters, 1991, 81 15~ 18.
- 9 Gow N A R, Gooday G W, New sam R J et al.. Ultrastructure of the septum in *Candida albicans*. Current Microbiology, 1980, 4 357~ 359.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 49 页 Continue from page 49)

参考文献

- 1 James C M et al. Growth and ω fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. Aquaculture, 1989, 77: 337~ 351.
- 2 Thompson P A. Effect of variation of temperature on the biochemical composition of species of marine phytoplankton. J Phycol, 1992, 28 481~ 499.

- 3 洪淇等. 温度对新月菱形藻、铲状菱形藻和耙夫藻的生长、总脂肪含量以及脂肪酸组成的影响. 水产学报, 1996, 20 (3): 235~ 240.
- 4 姜悦, 陈峰, 梁世中. 利用海洋微藻培养生产 $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸. 海洋科学, 1997, 6 18~ 20.
- 5 彭兴跃, 王大志等. 毫克级微藻样品中脂肪酸的分离及测定. 台湾海峡, 1998, 17 (3): 289~ 293.
- 6 李荷芳, 周汉秋. 海洋微藻脂肪酸组成的比较研究. 海洋与湖沼, 1999, 30 (1): 34~ 39.

(责任编辑: 蒋汉明)