

无机盐诱导蓝藻细胞液泡化

吴红艳 赵以军 郭厚良 程 凯 许 敏

(华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

摘要: 选用 NaCl、KNO₃、(NH₄)₂SO₄、MgSO₄、CaCl₂ 五种常用无机盐对分属三科的六种蓝藻进行液泡化诱导, 不同蓝藻其盐敏感性不同。鱼腥藻 sp.595 最为敏感, 五种盐均诱导其液泡化; 颤藻 284 和极大螺旋藻 438 最不敏感, 所试验盐类均不能诱导其液泡化; 念珠藻 sp.96、织线藻 246 和伪枝藻 248 液泡化程度居中, 少数盐类如 NaCl、KNO₃、(NH₄)₂SO₄ 对其有诱导作用。采用压片法观察到诱导形成的液泡, 液泡在相差显微镜下显示为圆球形, 基本透明。

关键词: 蓝藻; 无机盐; 液泡

中图分类号: Q949.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002)03-0234-05

盐胁迫对蓝藻的影响已经有了较为广泛的研究, 包括对蓝藻的生长、光合作用、固氮作用、蛋白质和 RNA 合成等方面的影响^[1,2]。已鉴定出鱼腥藻 sp.PCC 7120 (*Anabaena* sp.PCC 7120) 基因组中的盐诱导基因^[3]及聚胞藻 sp.PCC 6803 (*Synechocystis* sp.PCC 6803) 基因组中的盐调节基因^[4]。而有关盐胁迫对蓝藻细胞学方面影响的研究则比较少, 仅有的几篇文章涉及到细胞大小、细胞外被组织变化及质膜组装、细胞内颗粒增减和类囊体排列变化等方面^[5,6]。近年来, 郭厚良等在蓝藻原生质球研究中^[7,8]发现, 一些无机盐能引起鱼腥藻细胞发生泡状化结构^[9], 电镜检查发现, 此种泡状结构由单位膜包围, 故确定为液泡^[10], 并且已成功地分离出了无机盐诱导形成的液泡^[11]。无机盐对蓝藻的这种效应是否仅限于鱼腥藻, 其他蓝藻是否对盐诱导有同样的反应。为了弄清这个问题, 选用多种蓝藻进行了研究。结果表明: 无机盐诱导蓝藻细胞液泡化具有一定的普遍性。

1 材料和方法

1.1 藻种及培养 试验使用鱼腥藻 sp.595 (*Anabaena* sp.595)、念珠藻 sp.96 (*Nostoc* sp.96)、织线藻 246 (*Plectonema boryanum* 246)、伪枝藻 248 (*Scytonema hofmann* 248)、极大螺旋藻 438 (*Spirulina maxima* 438) 和颤藻 284 (*Oscillatoria animilis* 284) 等 6 种藻。藻种全部引

收稿日期: 2001-11-15; 修订日期: 2001-11-30

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 39870083); 武汉市青年科技晨光计划(编号: 985003072); 教育部重点项目(编号: 0087)资助

作者简介: 吴红艳(1976—), 山东省泰安市人; 现在中国科学院水生生物研究所攻读博士学位

通讯作者: 郭厚良, 武汉大学生命科学院, Email: hlguo@whu.edu.cn

赵以军, Email: Yjzhao@public.wh.hb.cn

自中国科学院水生生物研究所。将藻种活化,鱼腥藻 *sp.* 595、念珠藻 *sp.* 96、织线藻 246、伪枝藻 248 和颤藻 284 均采用 BG11 液体培养基,温度 26℃ (± 0.5),光照强度 2000lx。极大螺旋藻 438 采用 ZOK 液体培养基,温度 30℃ (± 0.5),光照强度 2200lx。活化后置于恒温光照生化培养箱中静置培养。

1.2 无机盐诱导处理 将 NaCl、KNO₃、(NH₄)₂SO₄、MgSO₄、CaCl₂ 5 种常用无机盐分别溶入液体培养基中,使其浓度均为 0.05mol/L,然后分别接种所试验 6 种藻进行培养,培养过程中不断取样观察细胞形态结构的变化。

1.3 液泡的压片检查 取培养物一滴,置于载玻片上,加盖玻片后吸去多余水分,然后用手掌或大拇指轻轻下压盖玻片,置于 NIKON E-600 相差显微镜下观察。

1.4 显微摄影及照片制作 用 Nikon Type 120 数码相机成像系统获取相片,采用 Epson Stylus Photo 750 打印机打印输出图片。

2 结果和分析

在培养过程中逐日在显微镜下观察,发现所试验的 6 种蓝藻对于盐诱导所产生的效应各不相同,现分述如下:

鱼腥藻 *sp.* 595 是一种具异形胞的丝状固氮蓝藻,细胞长圆(图 1:a)。在含盐培养基中培养 2—3d 后,细胞形态及结构发生明显变化:细胞膨大,两端变圆、甚至球形化,色素

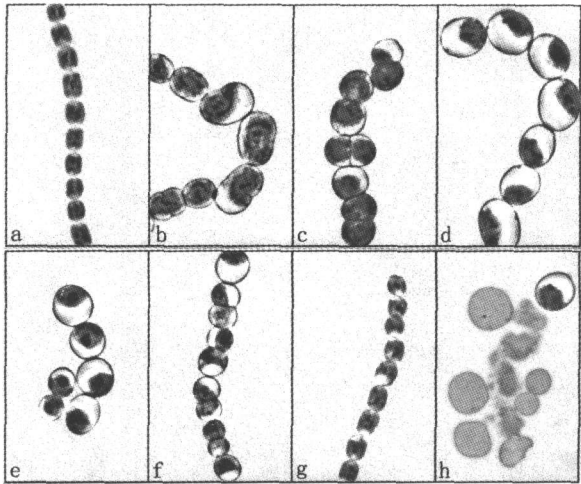


图 1 无机盐诱导的鱼腥藻 *sp.* 595 液泡化 (× 1600)

Fig.1 Salt-induced vacuolization in *Anabaena sp.* 595 (× 1600)
a. 未处理藻丝;b. 经 NaCl 诱导的藻丝,细胞膨大并有不均等分裂;c. 经 NaCl 诱导的藻丝,细胞膨大并有横向分裂;
d. 经 KNO₃ 诱导的藻丝,细胞膨大、液泡化均明显;e. 经 (NH₄)₂SO₄ 诱导的藻丝;f. 经 MgSO₄ 诱导的藻丝;g. 经 CaCl₂
诱导的藻丝;h. 经压片处理,细胞破裂,释放液泡(KNO₃ 诱导)
a. Untreated trichome; b. Trichome induced by NaCl. The cells inflated and performed unequational division; c. Trichome induced by NaCl. The cells inflated and performed longitudinal division; d. Trichome induced by KNO₃. The cells inflated and vacuolized obviously . e . Trichome induced by (NH₄)₂ SO₄; f . Trichome induced by MgSO₄. g . Trichome induced by CaCl₂; h. Treated with pressure, the cells broke and vacuoles were released (trichome induced by KNO₃)

质聚集于细胞一侧、液泡化,这种变化在钠盐、钾盐、铵盐中表现极为明显(图 1:b—e),而镁盐、钙盐的影响要小一些,细胞膨大不明显,只在开始两天内发生少数细胞的轻微液泡化(图 1:f—g),但鱼腥藻 sp.595 对钙、镁盐的反应也远较柱胞鱼腥藻(*Anabaena cylindrica*)和鱼腥藻 sp.PCC 7120 (*Anabaena* sp.PCC 7120)^[11]要大的多。

此外,还注意到:诱导液泡化的鱼腥藻 sp.595 藻丝细胞同时产生一些特殊的效应。在某些盐影响下,个别藻丝细胞发生特殊的细胞横向分裂及不均等分裂现象(图 1:b—c),这是一个新发现。细胞分裂方式的改变表明基因组复制后,多个基因组的分离受到干扰。横向分列使线形排列位置发生错动,引起藻丝发生弯曲。同时,可以推测横向分裂与分枝的产生有着一定的关系。

念珠藻 sp.96 也是一种具异形胞的丝状固氮蓝藻(图 2:a)。与鱼腥藻 sp.595 比较,念珠藻 sp.96 对无机盐的敏感性较差。五种盐中,NaCl、KNO₃ 和 (NH₄)₂SO₄ 可诱导细胞液泡化,但细胞膨大程度较小,液泡化程度也较轻(图 2:b—d)。经压片处理,可观察到细胞破裂和液泡释放。但奇怪的是,细胞破裂后,细胞质仍聚集于细胞附近不扩散,液泡裹在细胞质中,不能游离,显示不清楚。MgSO₄ 和 CaCl₂ 则不能诱导其液泡化,细胞形态不发生明显改变。

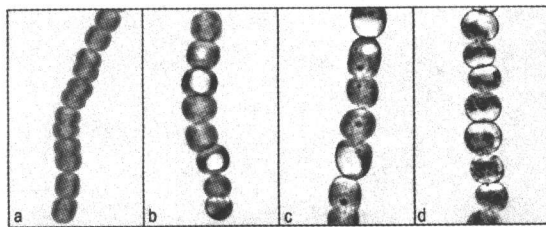


图 2 无机盐诱导念珠藻 sp.96 液泡化(×1600)

Fig.2 Salt-induced vacuolization in *Nostoc* sp.96(×1600)

a. 未处理藻丝;b. NaCl 诱导的藻丝;c. KNO₃ 诱导的藻丝;d. (NH₄)₂SO₄ 诱导的藻丝

a. Untreated trichome; b. Trichome induced by NaCl; c. Trichome induced by KNO₃; d. Trichome induced by (NH₄)₂SO₄

织线藻 246 也为多细胞丝状体,藻丝有明显薄胶鞘,无异形胞(图 3:a)。所试验无机

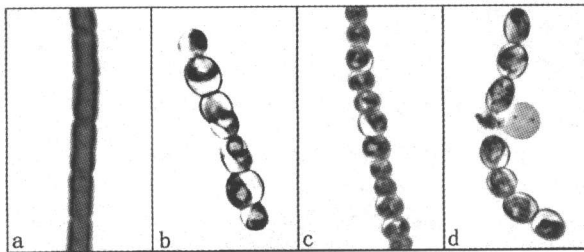


图 3 无机盐诱导的织线藻 246 液泡化(×1600)

Fig.3 Salt-induced vacuolization in *Plectonema boryanum* 246(×1600)

a. 未处理藻丝;b. NaCl 诱导的藻丝;c. KNO₃ 诱导的藻丝;d. 压片处理,细胞破裂,释放液泡(NaCl 诱导)

a. Untreated trichome; b. Trichome induced by NaCl; c. Trichome induced by KNO₃; d. Treated with pressure, the cells broke and vacuoles were released (trichome induced by NaCl)

盐中,仅 NaCl 诱导液泡化明显,液泡化程度比较高(图 3:b)。经压片处理,细胞破裂,液泡释出(图 3:d)。NaCl 诱导作用稍强于 KNO_3 , KNO_3 诱导所表现的突出的特点是细胞球形化明显,但液泡化程度比较低。而在铵盐、镁盐和钙盐作用下,不诱导藻丝细胞液泡化。

伪枝藻 248 为多细胞具假分枝的丝状体,有明显胶鞘,细胞为短柱形(图 4:a)。无机盐诱导液泡化,其特点为:细胞中央出现无色透明区,色素围于周边。所试验无机盐中,伪枝藻 248 仅对 KNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 两种盐敏感。 KNO_3 使细胞稍膨大,细胞内一般只出现一个较大的无色透明区(图 4:b)。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 影响下,藻丝变粗,细胞内出现多个小的无色透明区(图 4:c)。而诱导作用较强的 NaCl 则不能引起伪枝藻 248 细胞液泡化。观察到, MgSO_4 虽然不能诱导液泡化,但细胞分节却变的较为清楚。而 CaCl_2 则使藻丝黄化,抑制其生长。

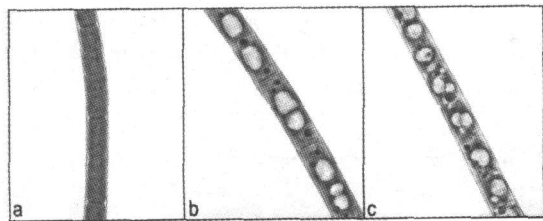


图 4 无机盐诱导伪枝藻 248 液泡化($\times 800$)

Fig.4 Salt-induced vacuolization in *Scytonema hofmanni* 248($\times 800$)

a. 未处理藻丝;b. KNO_3 诱导的藻丝;c. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 诱导的藻丝

a. Untreated trichome; b. Trichome induced by KNO_3 ; c. Trichome induced by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

颤藻 284 为多细胞丝状体,细胞呈圆柱状。无机盐诱导不液泡化,但细胞横壁显示,细胞内颗粒物质增多。

极大螺旋藻 438 为螺旋形丝状蓝藻。无机盐诱导均不能液泡化,但细胞横壁显示,长藻丝变为小片段,并出现圆形细胞,细胞进而破裂。

以上五种无机盐对六种蓝藻的诱导试验表明,无机盐可划分为两种类型,强效型和弱效型。 NaCl 、 KNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为强效型, CaCl_2 和 MgSO_4 为弱效型。 CaCl_2 和 MgSO_4 之所以呈弱效型,这可能与 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 相关,这两种离子在原生质体操作中作为膜保护剂使用,其作用显然与 Na^+ 和 K^+ 完全不同,其相关机理有待进一步研究。六种蓝藻也可划分为两类:易诱导型和不易诱导型。鱼腥藻 sp.595、织线藻 246、念珠藻 sp.96、伪枝藻 248 为易诱导型,可由无机盐诱导液泡化。颤藻 284 和极大螺旋藻 438 为不易诱导型,未观察到诱导液泡化。这两种不同类型藻划分的生物学基础也有待深入研究。

以上试验中,凡液泡化的藻丝都能通过压片法观察到液泡的存在,而蓝藻细胞是否具有液泡或是否形成液泡是一个尚不清楚的问题。曾有报道说,衰老的蓝藻细胞形成液泡。并认为,形成液泡是一种标志,表明细胞濒临死亡。亚显微结构研究也曾发现,蓝藻的老化细胞存在液泡式结构。还有人甚至提出,蓝藻正常细胞内就有液泡状结构。另有报道则指出,蓝藻的类囊体在一定条件下会泡状化或成为液泡式结构。但由于未能从蓝藻细胞中分离液泡以进行深入研究,因此蓝藻液泡的存在得不到普遍承认。以至于有人还认为,蓝藻液泡可能是一种人工假象。近年来,郭厚良等人在蓝藻原生质球工作中发现了液

泡,包括无机盐诱导的液泡和细胞液泡,并初步实现了液泡的分离。本实验所得到的结果为蓝藻液泡的确实存在提供了有利的新证据。不过,这种液泡有什么生理功能尚有待研究。

参考文献:

- [1] Sinha R P, Haeder D. Response of a rice field cyanobacterium *Anabaena* sp. To physiological stressors [J]. *Envir and Exper Botany*, 1996, **36**: 147—155
- [2] Jeanjean R, Matthijs H C P, Onana B, et al. Exposure of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 to salt stress induces concerted changes in respiration and photosynthesis [J]. *Plant cell Physical*, 1993, **34**: 1073—1079
- [3] Schwartz S H, Black J A, Jager K, et al. Regulation of an osmoticum-responsive gene in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 [J]. *J Bacteriol*, 1998, **180**(23): 6332—6337
- [4] Vinnemeier J, Hagemann M. Identification of salt-regulated genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 by subtractive RNA hybridization [J]. *Arch Microbiol* 1999, **172**(6): 377—386
- [5] Blunwald B, Tel-or E. Structural aspects of the adaptation of *Nostoc muscorum* to salt [J]. *Arch Microbiol*, 1982, **132**: 163—167
- [6] Stamatakis K, Ladas NP, Alygizaki-zorba A, et al. Sodium chloride-induced volume changes of freshwater cyanobacterium *synechococcus* sp. PCC 7942 cells can be probed by chlorophyll fluorescence [J]. *Arch Bio Chem Biophys*, 1999, **370**(2): 240—249
- [7] 郭厚良. 青霉素-溶菌酶法分离蓝藻原生质球[J]. 植物学报, 1990, **32**: 510—513
- [8] 郭厚良, 宋文贞, 金传荫. 五属七种蓝藻原生质球分离研究[J]. 水生生物学报, 1996, **20**: 93—94
- [9] 郭厚良, 金传荫, 宋文贞. 无机盐对蓝藻细胞结构影响和原生质球形成[J]. 水生生物学报, 1997, **21**: 190—193
- [10] 郭厚良, 黄开耀, 易平. KCl 诱导柱胞鱼腥藻形成液泡[J]. 水生生物学报, 1998, **22**: 198—199
- [11] 郭厚良, 易平, 浦秋文. 鱼腥藻 sp. PCC 7120 液泡的诱导和分离[J]. 武汉大学学报, 2000(4): 246—248

CELL VACUOLIZATION INDUCED BY INORGANIC SALTS IN CYANOBACTERIUM

WU Hong-yan, ZHAO Yi-jun, GUO Hou-liang, CHENG Kai and XU Min

(College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079)

Abstract: Six cyanobacteria were cultured in the presence of NaCl, KNO₃, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄ and CaCl₂, respectively for vacuole induction, and produced different effects. *Anabaena* sp. 595 was the most sensitive, vacuole could be induced by all salts tested. In contrast, no salts could induce cell vacuolization in *Oscillatoria animilis* 284 and *Spirulina maxima* 438. While *Nostoc* sp. 96, *Plectonema boryanum* 246 and *Scytonema hofmanni* 248 were the relatively sensitive strains, only NaCl, KNO₃ or (NH₄)₂SO₄ revealed the inducing effect on them. The induced vacuoles were examined by pressing the sample, and it was spherical and transparent in the scope of phase microscope.

Key words: Cyanobacterium; Inorganic salt; Vacuole