

鱼腥藻 SP.595 液泡化原生质球诱导条件的研究

冯武¹ 赵以军¹ 郭厚良² 夏燕华¹ 吴南¹

(1. 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079; 2. 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘要:用浓度为 0.15mol/L 的 KNO_3 、 KCl 、 K_2SO_4 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 NaNO_3 、 NaCl 、 Na_2SO_4 、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 、 CaCl_2 等单盐分别配合 0.1% 的溶菌酶处理鱼腥藻 sp.595 (*Anabaena* sp.595)。经 4h, KH_2PO_4 、 K_2SO_4 、 Na_2SO_4 、 NaH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 、 CaCl_2 能诱导形成原生质球, 但液泡化原生质球极少, 而 KNO_3 、 NaNO_3 、 NaCl 诱导形成少量液泡化原生质球。用相近浓度的双盐, 即 KNO_3 和 NaCl 、 KNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaCl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分别配合 0.1% 的溶菌酶处理, 诱导效果亦不佳。用相近浓度的三盐 NaCl 、 KNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及五种盐 NaCl 、 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2HPO_4 和 KH_2PO_4 分别配合 0.1% 的溶菌酶处理, 诱导原生质球和液泡化原生质球的效果明显提高, 液泡化原生质球比例达到 66.90%—79.97%。

关键词: 鱼腥藻 sp.595; 无机盐; 原生质球; 液泡化

中图分类号: Q949.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)04-0385-005

有学者认为蓝藻在营养缺乏或衰老时, 细胞有液泡形成^[1-2], 对蓝藻进行显微结构研究也发现其老化细胞内存在液泡化的结构^[3]。蓝藻有无液泡这一问题一直悬而未决。近来研究发现无机盐等能诱导蓝藻细胞形成液泡^[4], 并成功分离了此种液泡^[5]。在进一步的研究中又发现正常的非液泡化藻细胞还可在诱导原生质球时与原生质球同步形成液泡, 此种液泡也极易分离^[5-6]。但是非液泡化的正常细胞为什么能形成液泡化原生质球, 这显然是一个值得研究的新问题。本实验选择了鱼腥藻 sp.595, 利用不同的无机盐配合溶菌酶进行处理, 对非液泡化正常细胞形成液泡化原生质球的条件进行了初步的探索。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养 鱼腥藻 sp.595 (*Anabaena* sp.595) 为多细胞丝状(图 1(a)), 藻种引自中国科学院水生生物研究所。用 BG11 液体培养基培养, 温度 26℃ (±0.5), 光照强度 2000lx, 置于恒温光照生化培养箱静置培养, 间或振荡。每 4d 接一次种, 进行连续培养, 用培养 4d 的材料作处理。

1.2 无机盐诱导处理 将 KNO_3 、 KCl 、 K_2SO_4 、

KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 NaNO_3 、 NaCl 、 Na_2SO_4 、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 、 CaCl_2 等单盐分别溶入蒸馏水中, 使其浓度为 0.15mol/L, 并加入 0.1% (W/V) 的溶菌酶, 对鱼腥藻 sp.595 进行处理; KNO_3 和 NaCl 、 KNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaCl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等三种组合, 两种盐的浓度分别为 0.075mol/L, 处理方法与单盐相同; 三种盐 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaCl 和 KNO_3 浓度分别为 0.05mol/L, 处理方法与单盐相同; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaCl 和 KNO_3 以 0.05mol/L 浓度溶入磷酸缓冲液 (Na_2HPO_4 和 KH_2PO_4 , 1/15mol/L, pH=6.8) 中, 再加入 0.1% 的溶菌酶对鱼腥藻 sp.595 进行处理。酶解温度为 28℃。在处理过程中, 不断取样检查原生质球的形成, 并在处理 4h 统计原生质球形成率和液泡化原生质球的比例。重复三次, 取平均值。

1.3 显微摄影及照片制作 用 Nikon E-600 微分干涉显微镜观察, 用 Nikon Type 950 数码相机成像系统拍摄, 采用 Epson Stylus Photo750 打印机输出照片。

2 结果和分析

从表 1 可以看出, 以单盐作为渗透剂诱导原生质球的效果较差, 其中 K_2HPO_4 和 Na_2HPO_4 完全看

收稿日期: 2002-03-15; 修订日期: 2002-10-16

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 39870083); 教育部科学技术研究重点项目(教技司[2000]156 号文, 项目编号: 00087)资助项目

作者简介: 冯武(1973—), 女, 福建福州市人; 在读硕士研究生; 主要从事微生物生态研究

通讯作者: 郭厚良

不到效果,可能由于碱性环境中溶菌酶的活性不稳定。只有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的效果相对较好,约28.63%的细胞变成原生质球(图1(b))。其他盐效果较差,如 KH_2PO_4 (图1(c))原生质球形成比例约为12.67%,但许多细胞(图1(a))明显发生形态改变,球形化,属于原生质球。而在KCl中虽有原生质球形成(图1(d)),但极易破裂,原生质球不能稳定,以致无法统计。三种组合双盐的效果有所不同,显示两种不同的情况,在组合(1)和(2),双盐的效果明显较两种单盐更差,双盐诱导的原生质球形成率比两种单盐都明显要低,说明两种盐的诱导作用抵消,而在组合(3),两种盐的组合效应优于单盐,双盐诱导的原生质球形成率比两种单盐都明显要高,形成了很好的原生质球(图1(e))。而三盐和五盐组合的情况就完全不同了,不同的盐产生明显的协同作用,原生质球形成率大幅度提高,原生质球结构比较好(图1(f))。

在所形成的原生质球中,液泡化原生质球所占比例则显示了不同的情况。单盐中 KH_2PO_4 、 K_2SO_4 、 Na_2SO_4 、 NaH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 、 CaCl_2 诱导时几乎无液泡化原生质球出现,但三种单盐 KNO_3 、 NaNO_3 、 NaCl 能够诱导液泡化原生质球形成,如 KNO_3 诱导的液泡化原生质球形成率约为33.33%(图2(a))。而双盐、三盐和五盐诱导都形成液泡化原生质球(图2(b)–(c))。在单盐诱导中, NaNO_3 原生质球形成率很低(6.34%),但液泡化原生质球形成率却很高(61.11%),同样的现象出现在双盐组(1),由此说明诱导原生质球和液泡化原生质球所需条件是不同的,其机理也不同,在双盐组合(3)中液

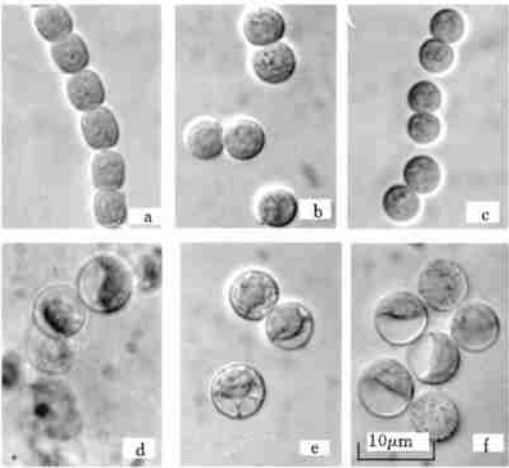


图1 不同无机盐及无机盐组合诱导鱼腥藻 sp.595 形成的原生质球

(a) 正常藻丝;(b) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 诱导的原生质球;(c) KH_2PO_4 诱导的原生质球;(d) KCl 诱导的原生质球;(e) NaCl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 诱导的原生质球;(f) 五种盐诱导的原生质球

Fig.1 Spheroplasts in *A. sp.* 595 induced by different inorganic salts and combinations of different inorganic salts
(a) Uncontrolled trichome; (b) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (c) KH_2PO_4 ; (d) KCl; (e) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and NaCl; (f) Mixed salts of five kinds

泡化原生质球的比例较高。而在三盐和五盐组合中,则出现了双高,即原生质球形成率高,与此相平行液泡化原生质球比例也很高,这说明在诱导液泡化原生质球的效应上,不同无机盐也能显示强烈的互补效应。多盐组合所形成的原生质球经低渗处理,原生质球立即破裂,液泡释放(图2(d)),与郭厚良等人^[6,7]报道一致。

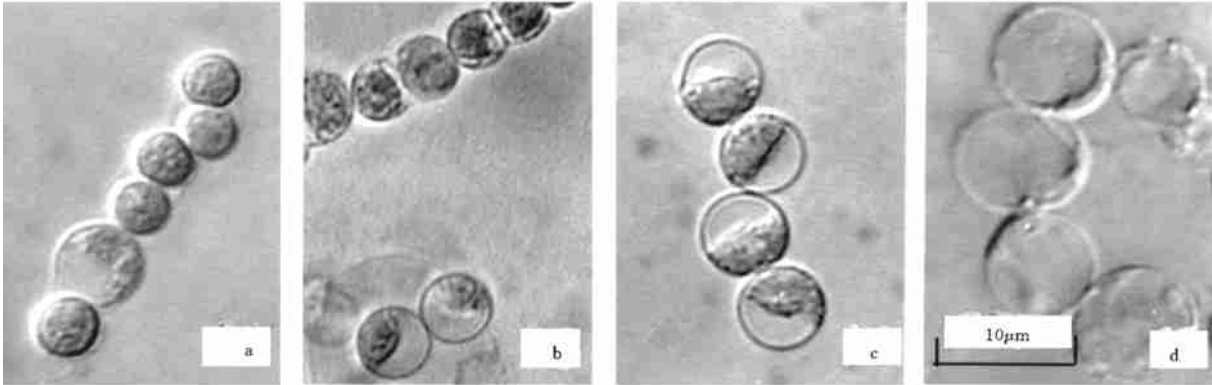


图2 不同无机盐及无机盐组合诱导鱼腥藻 sp.595 形成的液泡化原生质球

(a) KNO_3 诱导的液泡化原生质球;(b) NaCl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 诱导的液泡化原生质球;(c) 五种盐诱导的液泡化原生质球;(d) 释放的液泡

Fig.2 Vacuolized spheroplasts in *A. sp.* 595 induced by different inorganic salts and combinations of different inorganic salts
(a) KNO_3 ; (b) NaCl and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (c) Mixed salts of five kinds; (d) Released vacuoles

表 1 不同无机盐及无机盐组合对鱼腥藻 sp.595 的效应

Tab.1 The effects in *Anabaena* sp.595 by different inorganic salts and combinations of different inorganic salts

	盐的种类 Inorganic salts	原生质球形成率(%) Percentage of protoplasts	液泡化原生质球比例(%) Percentage of Vacuolized protoplasts	酶处理液 pH 值 pH of salt solution mixed with lysozyme	说明 Remark
单盐 One kind of salt	KNO ₃	17.76	33.33	5.78	
	KCl			5.51	原生质球大量破裂, 无法计数
	K ₂ SO ₄	17.16	/	5.55	
	KH ₂ PO ₄	12.67	/	4.54	
	K ₂ HPO ₄			8.75	无明显效果
	NaNO ₃	6.34	61.11	5.74	
	NaCl	17.79	15.19	5.39	
	Na ₂ SO ₄	14.61	/	5.38	
	NaH ₂ PO ₄	13.06	/	4.51	
	Na ₂ HPO ₄			8.75	无明显效果
	(NH ₄) ₂ SO ₄	28.63	/	5.40	有液泡化的细胞形成
	MgSO ₄	13.96	/	5.44	
	CaCl ₂	10.63	/	5.79	
双盐 (Two kinds of salts)	(1) KNO ₃ 、NaCl	6.22	52.94	5.88	
	(2) KNO ₃ 、(NH ₄) ₂ SO ₄	10.57	6.34	5.31	
	(3) NaCl、(NH ₄) ₂ SO ₄	32.32	30.19	5.43	
三盐 (three kinds of salts)	NaCl、KNO ₃ 、 (NH ₄) ₂ SO ₄	54.42	66.90	5.61	
五盐 (Mixed salts of five kinds)	NaCl、KNO ₃ 、(NH ₄) ₂ SO ₄ 、 Na ₂ HPO ₄ 和 KH ₂ PO ₄	61.02	79.97	6.68	

3 讨论

自 Biggins 首先报道制备有活力的蓝藻原生质球以来^[8], 蓝藻原生质球制备在方法一直都没有得到很好的解决,Biggins 的方法很难得到大批量且稳定可操作的原生质球。后来, 这方面困难由郭厚良解决, 他使用多盐复合液为渗透稳定剂加青霉素预处理成功地制备了大量和稳定的蓝藻原生质球^[9], 但是后来才发现各种盐类存在互补作用^[10]。本实验再次成功证明, 多盐的协同作用是制备蓝藻原生质球必不可少的, 而其内在机理一时还难以分析。

郭厚良当初制备的原生质球是否是属液泡化原生质球, 当时也并不知道, 而只知道“细胞的透明度大大提高”和“出现无色透明区”, 结果本来已出现的液泡当时并未注意到。而第一次提出原生质球的“液泡化”现象的是 Belliner^[12], 可惜他未加重视, 结果蓝藻液泡还是最后由郭厚良等发现^[4], 并很快注

意到原生质球的液泡化并将这一现象用于液泡制备^[11]。本实验在此基础上进一步探讨原生质球液泡化的条件, 上述实验结果表明, 一些单盐也有诱导原生质球液泡化的作用, 但作用比较弱, 很难加以利用。这样同制备原生质球一样, 多盐协同作用也是诱导液泡化原生质球必不可少的, 高频率液泡化原生质球的制备为液泡的高得率制备创造了条件, 而液泡化原生质球中的液泡和液泡化蓝藻细胞中的液泡是否存在差异尚有待进一步分析。

参考文献:

[1] Von Zastrow E M.Über die organization der *Cyanophy ceenzelle*[J]. *Arch Mikrobiol.* 1953, **19**: 174—205

[2] Desikachary T V. *Cyanohyta*[M]. Neu Delhi: Indian council of Agricultural Research, 1959, TP, 1—687

[3] Ermakova L R, Nikitina K A. Age-related changes in the ultrastructure of *Anbaena Variabilis* cells[J]. *Mikrobiologiya*, 1997, **46**(2): 324—328

(C)1994-2025 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[4] Guo H L, Huang K Y, Yi P. Vacuole formation by KCl induction in a blue-green alga *Anabaena cylindrica* [J]. *Acta Hydrobiol. Sin.*, 1998, **22**: 196—197. [郭厚良, 黄开耀, 易平, 等. KCl 诱导柱胞鱼腥藻形成液泡. 水生生物学报, 1998, **22**: 196—197]

[5] Guo H L, Zhao Y J. Preparation of spheroplasts and isolation of vacuoles from the Cyanobacterium *Spirulina platensis* [J]. *Bulletin of national natural science foundation of china*, 2000, **14**: 356—358. [郭厚良, 赵以军. 钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 原生质球制备和液泡分离[J]. 中国科学基金, 2000, **14**: 356—358]

[6] Guo H L, Yi P. Induction and isolation of vacuoles from the blue-green alga *Anabaena* PCC 7120 [J]. *J. Wuhan Univ.*, 2000, **4**: 246—248. [郭厚良, 易平, 蒲秋文, 等. 鱼腥藻 sp. PCC7120 液泡的诱导和分离. 武汉大学学报, 2000, **4**: 246—248]

[7] Wu H Y, Zhao Y J, Guo H L. The formation of cyanobacteria vacuole under unfavorable pH [J]. *Progress in Natural Science*, 2001, **11**(7): 761—765. [吴红艳, 赵以军, 郭厚良, 等. 不利于生长的 pH 条件下蓝藻液泡的形成. 自然科学进展, 2001, **11**(7): 761—765]

[8] Biggins J. Preparation of metabolically active protoplasts and particle preparations from the blue-green alga *Phormidium lucidum* [J]. *Plant Physiol*, 1967, **42**: 1442—1446

[9] Guo H L. Penicillin-lysozyme method to isolate the spheroplasts from blue-green algae [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1990, **32**(7): 510—513. [郭厚良. 青霉素-溶菌酶法分离蓝藻原生质球. 植物学报, 1990, **32**(7): 510—513]

[10] Chen X J, Guo H L. Complementary effect of osmotic stabilizers and their roles in degradation cell walls of blue-green algae [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1995, **37**(10): 786—790. [陈贤均, 郭厚良. 渗透稳定剂的互补效应及某些渗透稳定剂对蓝藻细胞壁的降解作用. 植物学报, 1995, **37**(10): 786—790]

[11] Guo H L, Jin C Y, Pu Q W. Synchronous induction of spheroplasts and vacuoles in the cyanobacterium *Anabaena* pcc7120 [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, **25**: 92—94. [郭厚良, 金传荫, 蒲秋文, 等. 鱼腥藻 *Anabaena* PCC7120 原生质球和液泡的同步诱导. 水生生物学报, 2001, **25**: 92—94]

[12] Marpha D B, Deborah N F, Rosen B H, et al. Protoplast induction in *Anabaena variabilis* Kütz and *Anabaena azollae* Stras [J]. *Protoplasma*, 1987, **139**: 36—40

THE STUDY ON INDUCING CONDITIONS OF VACUOLIZED SPHEROPLASTS IN *ANABAENA* SP.595

FENG Wu¹, ZHAO Yi-Jun¹, GUO Hou-Liang², XIA Yan-Hua¹ and WU Nan¹

(1. College of Life Science of Central China Normal University, Wuhan 430079;

2. College of Life Science of Wu Han University, Wuhan 430072)

Abstract: Some researchers have the opinion that cyanobacteria can form vacuoles owing to lack of nutrition or senescence. There were vacuoles in the old cells while the micrographic structure of cyanobacteria was studied. Whether there are vacuoles in the cyanobacteria is still in the air. The recent study shows that some inorganic salts can induce the formation of vacuoles in cyanobacteria and this kind of vacuole has been isolated successfully. The further study shows inorganic salts can induce vacuoles and spheroplasts in the unvacuolized normal cells of cyanobacteria simultaneously. This kind of vacuole also can be isolated easily. Why the unvacuolized normal cells of cyanobacteria can form the vacuolized spheroplasts? It is a new problem worthwhile to study. This research chooses *Anabaena* sp.595 to treat in the presence of several different combinations of some inorganic salts with 0.1% (w/v) mixed with lysozyme, and a preliminary study on the inducing conditions of vacuolized spheroplasts in cyanobacteria has been done. *Anabaena* sp.595 was treated in the presence of 0.15ml/1 KNO₃, KCl, K₂SO₄, KH₂PO₄, K₂HPO₄, NaNO₃, NaCl, Na₂SO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄ and CaCl₂ mixed with 0.1% (w/v) lysozyme for 4 hours. The results show that protoplasts rather than vacuolized spheroplasts could be easily induced by KH₂PO₄, K₂SO₄, Na₂SO₄, NaH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄ and CaCl₂. On the contrary, rich vacuolized spheroplasts were induced by KNO₃, NaNO₃ and NaCl. The inducing effects were not evident under the treatment of two salts of similar concentration like KNO₃ and NaCl, KNO₃ and (NH₄)₂SO₄, NaCl and (NH₄)₂SO₄ mixed with 0.1% (w/v) lysozyme. However, the inducing rate of both the spheroplasts and vacuolized spheroplasts markedly increased by three salts of similar concentration like NaCl, KNO₃ and (NH₄)₂SO₄ with 0.1% (w/v) mixed with lysozyme; similar results were obtained under the treatment of five salts of NaCl, KNO₃, (NH₄)₂SO₄, Na₂HPO₄ and KH₂PO₄ mixed with lysozyme. On these conditions, the percentage of vacuolized spheroplasts reached 66.90% ~ 79.97%. The results mentioned above indicate that some kinds of inorganic salt have the effects of inducing the spheroplasts to form vacuoles. But because the effects are very weak, it is difficult to apply single inorganic salt to induce the spheroplasts to form vacuoles in practice. The results also show that synergistic effects of several kinds of inorganic salt are necessary to induce the spheroplasts to form vacuoles. The preparation of high frequency spheroplasts makes for the high yield of vacuoles. However, this study can not answer whether there are some differences between the vacuoles in the vacuolized spheroplasts and that in the normal cells of cyanobacteria. The further study on this question will be useful.

Key words: *Anabaena* sp.595; Inorganic salt; Spheroplasts; Vacuolization