

\* \* \* \* \*  
\* 研究简报 \*  
\* \* \* \* \*

## 无机盐对蓝藻细胞结构的影响和原生质球形成

郭厚良 金传荫<sup>1)</sup> 宋文贞

(武汉大学生命科学学院, 430072) 1) (中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### EFFECTS OF INORGANIC SALTS ON THE STRUCTURE OF CELLS AND FORMATION OF SPHEROPLASTS IN BLUE — GREEN ALGAE

Guo Houliang, Jin Chuanyin<sup>1)</sup> and Song Wenzhen

(College of Life Sciences, Wuhan University, 430072)

1) (Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072)

**关键词** 蓝藻, 无机盐, 细胞结构, 原生质球, 再生

**Key words** Blue — green algae, Inorganic salts, Cell structure, Spheroplasts, Regeneration

1989年, Lanfaloni等报道使用1.5mol/L NaCl处理得到钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis* Geitl.)原生质球, 并使原生质球再生<sup>[1]</sup>。在渗透稳定剂试验中, 作者也意外地发现, 通过0.15mol/L酒石酸铵处理可得到席藻原生质球, 也提出某些渗透稳定剂降解蓝藻细胞壁的观点<sup>[2]</sup>。上述发现似乎都属于某种特殊的例外。然而, 在为改进原生质球培养所作的蓝藻盐适应培养试验<sup>[3]</sup>中, 又重复发现了盐溶液导致蓝藻细胞壁发生降解作用, 并发现盐溶液同时引起蓝藻细胞结构发生重大变化。盐溶液的这种作用使柱胞鱼腥藻细胞转化为原生质球, 此种原生质球能培养再生<sup>[4]</sup>。这一研究结果和Lanfaloni等的工作有类似之处, 但又有很大不同, 所涉及的是一系列的盐类和多种蓝藻。本文报道对这一问题所作的初步实验。

#### 1 材料和方法

本试验主要用柱胞鱼腥藻(*Anabaena cylindrica*)。对其他种类, 如水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae* Breb.), 明亮席藻(*Phormidium lucidum*)和粘球藻(*Synechococcus* sp.)等也进行了部分试验。材料引自中国科学院水生生物研究所, 用Allen氏液体培养基培养, 培养在恒温光照生化培养箱(广东医疗仪器厂)中进行, 温度28℃(±0.5℃), 光照强度2000lx。

国家自然科学基金资助项目

1996年1月1日收到; 1996年10月19日修回。

**1.1 不同盐类对蓝藻细胞结构的影响** 共试验了  $\text{KCl}$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{CaSO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$  等 18 种常用无机盐类。试验的最初目的是筛选对蓝藻生长影响最小的盐类以用于原生质球再生培养, 正如在真菌上所作过的那样<sup>[5]</sup>。试验时, 将盐溶入培养基, 然后接种蓝藻, 浓度均使用  $0.05 \text{ mol/L}$ 。 $\text{CaSO}_4$  使用饱和溶液, 浓度约  $0.01 \text{ mol/L}$ 。培养中, 除观察生长外, 并作镜检。

**1.2  $\text{KCl}$  和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的作用与浓度的关系**  $\text{KCl}$  使用  $0.005$ 、 $0.025$ 、 $0.1$ 、 $0.15$  和  $0.25 \text{ mol/L}$  等五种浓度,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  使用  $0.005$ 、 $0.01$ 、 $0.025$ 、 $0.05$  和  $0.1 \text{ mol/L}$  等五种浓度。培养 3 d 后, 检查细胞结构变化, 统计结构变化细胞比例, 测量细胞长度, 以作为影响大小比较的指标。

**1.3 其他因子对  $\text{KCl}$  作用的影响** 作了三种因子。(1)蒸馏水: 将  $\text{KCl}$  溶于蒸馏水至  $0.05 \text{ mol/L}$ , 然后接种蓝藻培养观察。(2)无氮: 将  $\text{KCl}$  溶入无氮培养基, 接种蓝藻。(3)  $\text{CaCl}_2$ : 使用  $0.05 \text{ mol/L}$   $\text{KCl}$  和  $0.025 \text{ mol/L}$   $\text{CaCl}_2$  的混合液培养蓝藻。

**1.4  $\text{KCl}$  培养柱胞鱼腥藻形成原生质球** 将  $\text{KCl}$  的浓度由  $0.05 \text{ mol/L}$  提高至  $0.1 \text{ mol/L}$ , 渗透压达到与蓝藻细胞液等渗的水平。培养 14 d 后, 对所形成的球形细胞作低渗试验, 采取两种方式。(1)从盖玻片一侧滴加蒸馏水, 然后沿盖玻片滴水一侧观察统计细胞破裂率。(2)将细胞转入蒸馏水, 静置一夜, 次日检查。

**1.5 原生质球培养试验** 将  $\text{CaCl}_2$  溶入培养基, 浓度为  $0.15 \text{ mol/L}$ , 接种原生质球, 逐日检查。

**1.6  $\text{KCl}$ —溶菌酶处理试验** 将  $0.1 \text{ mol/L}$   $\text{KCl}$  中培养 10 d 左右的材料作附加溶菌酶处理, 各种条件同前<sup>[8]</sup>, 以正常藻丝作对照。经酶处理后的原生质球用同样的  $\text{CaCl}_2$  培养基进行再生培养。

## 2 结果和讨论

**2.1 包括无机盐在内的多种渗透稳定剂对蓝藻细胞的影响**, 曾有过研究在高渗条件下, 渗透稳定剂本身引起蓝藻细胞大量破裂。如将渗透压降至等渗水平, 此种现象就避免了。使人意想不到的是, 在本次试验中, 低渗水平的无机盐引起蓝藻细胞结构发生很大改变。显微检查发现, 在含钾、钠和铵的盐酸盐, 硝酸盐及硫酸盐的培养中, 柱胞鱼腥藻在 3 d 之后都发生一种共同的结构变化: 细胞体积增大, 两端变圆甚至完全球形化, 细胞色素质聚集于细胞一端, 另一端成为一段无色素质的透明区(图版 I: 2)。对  $\text{KCl}$  和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  处理作持续观察表明, 随着时间推移, 细胞体积不断增大, 并球形化, 藻丝解体为片段。10 d 以后, 球形细胞逐渐破裂, 留下异形胞。少数藻丝显示抗性, 不受影响, 细胞结构不变。但是, 磷酸盐、镁盐和钙盐对细胞影响比较小。尤其是钙盐,  $\text{CaSO}_4$  只发生片段化,  $\text{CaCl}_2$  和  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  在 3 d 内几乎完全不引起细胞结构产生可见变化。

为了说明这种现象的普遍性, 我们用其他蓝藻进行了同样的试验, 证明许多蓝藻都会发生相同的结构改变, 但不同的种类敏感程度不同, 对所感受的盐种类也不同。例如水华鱼腥藻对  $\text{KCl}$  不敏感, 而对  $\text{NaNO}_3$  较为敏感(图版 I: 2, 4)。

**2.2  $\text{KCl}$  和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  不同的浓度对细胞影响程度不同(表 1、2)** 结构变化细胞比例指色素质区域占细胞体积一半以下的细胞对总调查细胞数的比例。细胞大小以长度计, 以对照细胞为 100% 相比较。从表 1 可以看出, 在  $0.1 \text{ mol/L}$  以下,  $\text{KCl}$  的作用随浓度提高而加强。在  $0.1 \text{ mol/L}$  以上, 浓度提高作用反而减弱。这一试验结果与前面所作的盐适应培养<sup>[3]</sup> 正相吻合, 在盐适应培养试验中,  $0.1 \text{ mol/L}$  为一分界线, 在此浓度以下蓝藻可稳定增长, 在此浓度以

表 1 KCl 的作用和浓度的关系

Tab.1 Effect of KCl in relation with its concentrations

浓 度 (mol /L) Concentrations	结构变化细胞比例 (%) Percentage of cells with structural change	细胞相对大小 (%) Relatice size of cells
0.005	16.2	110.7
0.025	50.6	135.7
0.100	77.3	142.9
0.150	62.2	121.4
0.250	8.7	110.7
0.000	0.0	100.0

表 2  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的作用和浓度的关系Tab.2 Effec of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in correlation with its concentrations

浓 度 (mol /L) Concentrations	结构变化细胞比例 (%) Percentage of cells with structural change	细胞相对大小 (%) Relatice size of cells
0.005	97.9	182.1
0.010	93.4	189.3
0.020	83.3	178.6
0.050	87.4	153.6
0.100	7.4	107.1
0.000	0.0	100.0

上, 生长明显抑制。而  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的试验结果(表 2)有所不同。由于氨毒害作用,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的抑制作用特别强烈, 浓度越高, 抑制作用越大。最小的浓度 0.005 mol / L 抑制作用最小, 对细胞结构的影响最大。因此浓度试验似乎说明, 盐对细胞结构的影响是通过生长细胞起作用。如果细胞不生长, 盐本身不能引起细胞结构改变。

**2.3** 将蓝藻培养在含 KCl 的蒸馏水中, 藻细胞基本上不生长, 细胞不发生明显的结构改变。在含 KCl 的无氮培养基中, 细胞生长微弱, 结构也无明显变化, 试验结果与上述浓度试验一致。此外, 在  $\text{CaCl}_2$  和 KCl 的混合液中细胞结构不发生改变。而且在 KCl 作用下细胞结构已发生改变, 若加入  $\text{CaCl}_2$ , 3—5 d 细胞结构就能恢复正常, 这一试验为使用  $\text{CaCl}_2$  培养柱胞鱼腥藻原生质球提供了依据。

**2.4** 在上述试验中, KCl 引起细胞球形化暗示细胞壁降解作用。为此, 将 KCl 的浓度由 0.05 mol / L 提高到 0.1 mol / L, 达到与细胞等渗的水平<sup>[7]</sup>。结果, 细胞球形化, 但不破裂。有时, 可达到以单球体占优势的水平(图版 I, 3)。玻片低渗试验检查, 2 min 之内的低渗破裂率可达 80% 以上。若在低渗条件下培养一夜, 培养物退去蓝色, 细胞绝大部分破裂。因此, 对低渗敏感的球形细胞应视为原生质球。除柱胞鱼腥藻外, 其他多种蓝藻的类似处理效果较差, 其中水华鱼腥藻经 0.1 mol / L  $\text{NaNO}_3$  培养 20 d 可引起大多数细胞发生同样的结构改变, 但低渗敏感细胞只有 28% 左右。

**2.5** 用含  $\text{CaCl}_2$  的培养基培养, 原生质球顺利再生, 再生率 50% 以上。这一再生率与 Lanfaloni 螺旋藻原生质球的再生率相当。不断重复进行的再生试验发现, 原生质球的再生分裂有均等分裂, 出芽分裂和不规则分裂(图版 I: 5 a—7 a)。经多次连续分裂, 形成多细胞藻体片段, 体积巨大的原生质球逐渐回到正常细胞大小(图版 I: 5 b—7 b)。

原生质球再生时, 色素质先行生长, 向无色透明区扩展, 充满整个细胞后, 再进入分裂。但对照抗低渗细胞遵循另一条再生路线: 色素质尚未充分生长, 细胞便进入分裂(图版 I: 8)。表明对照细胞壁保留比较多, 故再生分裂比较快。

**2.6** 经 0.1 mol / L KCl 培养 7—9 d 的柱胞鱼腥藻转入溶菌酶处理, 在 28 °C 下经 3—4 h, 球形细胞低渗破裂率几乎达到 100%, 成为细胞壁解水平更高的原生质球, 这一酶处理时间和青霉素—溶菌酶法的酶处理时间相当。但同样的时间内, 未经 KCl 培养的藻丝只有不足半数细胞转化为原生质球。这充分说明, KCl 培养使细胞对溶菌酶的敏感性大大提高。同时, 将此原生质球转入 0.15 mol / L  $\text{CaCl}_2$  液体培养基培养, 原生质球也顺利再生, 再生率也比较高, 再生方式完全相同。

综上所述, 多种盐类能引起蓝藻, 特别是柱细胞鱼腥藻发生显著结构改变, 这种改变已成功地用于原生质球制备和培养, 但是这种结构改变的许多细节有待更深入的亚显微研究。

## 参 考 文 献

- [1] Lanfaloni L A, et al. Production and regeneration of spheroplasts from the cyanobacterium *spirulina platensis*, *FEMS Microbiology Letters*, 1989, **59**: 141—146
- [2] 陈贤均、郭厚良, 渗透稳定剂的互补效应和某些渗透稳定剂对蓝藻细胞壁的降解作用, 植物学报, 1995, **37**: 386—390
- [3] 陈贤均、郭厚良, 蓝藻盐适应培养的研究, 武汉植物学研究, 1995, **13**: 349—353
- [4] 郭厚良、周明、金传荫. 蓝藻半原生质球、原生质球制备、培养再生和融合, 武汉大学学报(自然科学版), 1996(生物工程专辑): 130—134
- [5] Pebern J F. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion, *Ann Rev Microbiol*, 1979, **33**: 21—39

## 图 版 说 明

### 图 版 I

1. 未处理藻丝。 $\times 1160$ ; 2. 在 0.05 mol / L KCl 中培养 3 d 的藻丝。 $\times 1160$ ; 3. 在 0.1 / L mol  $\text{NaNO}_3$  中培养 20 d 的水华鱼腥藻丝。 $\times 1160$ ; 4. 在 0.1 mol KCl 中培养 2 周形成的柱胞鱼腥藻原生质球。 $\times 1160$ ; 5a. 原生质球的均等分裂。 $\times 1160$ ; 5b. 由均等分裂形成的藻丝片段。 $\times 1160$ ; 6a. 原生质球出芽。 $\times 1160$ ; 6b. 由出芽形成的藻丝片段。 $\times 1160$ ; 7a. 原生质球的不规则分裂。 $\times 1160$ ; 7b. 由不规则分裂形成的藻丝链。 $\times 1160$ ; 8. 抗低渗球形细胞的分裂。 $\times 1160$

1. Untreated trichome.  $\times 1160$ ; 2. Trichome growing for 3 d days in the medium containing 0.05 mol / L KCl.  $\times 1160$ ; 3. Spheroplasts formed after 20 d incubation in the medium containing 0.1 mol / L KCl.  $\times 1160$ ; 4. Trichome of *Anabaena flos—aquae* growing for 14 days in the medium containing 0.1 mol / L  $\text{NaNO}_3$ .  $\times 1160$ ; 5a. Equational division of a spheroplast.  $\times 1160$ ; 5b. A trichome segment from equational division.  $\times 1160$ ; 6a. Budding of a spheroplast.  $\times 1160$ ; 6b. A trichome from budding.  $\times 1160$ ; 7a. Irregular division of a spheroplast.  $\times 1160$ ; 7b. Trichome chains from irregular division.  $\times 1160$ ; 8. Division style of spherical cells which resistant to hypotonic condition.  $\times 1160$