

真菌粗糙链孢霉原生质体对蓝细菌粘球藻的摄取及融合的研究

周宏斌* 陈廷伟

(中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京)

运用遗传工程新技术, 将固氮基因转移到非豆科植物, 已成为当前生物固氮研究领域一个富有挑战性的研究课题。目前固氮遗传工程的发展虽已能在几个种、属细菌之间转移固氮基因^[1,2], 但迄今尚未能在高等植物中取得突破。近十年来, 固氮细胞工程有了更快的发展, 因为运用遗传操作技术可能实现固氮基因群体转移。1976年美国马里兰大学将固氮蓝细菌粘球藻 *Gloeocapsa* sp. 导入玉米和烟草原生质体中, 试图在植物细胞中建立光合固氮新体系^[3]。此后, 相继有人进行这方面的研究^[4-9]。将单细胞固氮蓝细菌融合到高等植物原生质体中, 目前虽未观察到固氮功能的表达^[8,6,7,10,11], 但意义重大。本实验以粗糙链孢霉为植物细胞模拟体, 研究真菌原生质体摄取固氮蓝细菌粘球藻的过程和复壁后再生的可能性, 并探索蓝细菌球形体和原生质体融合条件, 取得了初步研究结果。

材料和方法

(一) 固氮粘球藻的分离培养和球形体分离

从北京、山东、湖南等地稻田及红萍培养物中分离到4株单细胞蓝细菌粘球藻^[1]。其分离培养、纯化方法及菌种鉴定等研究结果将另文报道。分离粘球藻所用培养基系采用Allen无氮培养基^[12], 并

在25℃, 2500—3000lx 日光灯下培养。经测定, 纯化的粘球藻固氮酶活性在有氧时平均为66.6nmol 乙烯/g鲜重·h, 无氧时平均为280nmol 乙烯/g鲜重·h。此种蓝细菌为椭圆形单细胞, 大小约5×6μ, 常以2、4、或8个细胞相聚在一起, 外包以无色透明的包被。为便于真菌原生质体摄取, 事先以超声波(2KH, 100W)处理藻团1.5—2min, 去除其外层包被, 使之分散为单个菌体。

为了获得粘球藻的球形体(Spheroplast)(即去掉细胞壁的原生质体), 将上述无包被的菌体用0.5%溶菌酶磷酸缓冲溶液处理1—1.5h, 整个处理过程必须在28—30℃水浴摇床上进行, 保温振荡1h后取出立即放入冰水中终止酶作用, 离心洗涤去掉酶液并收集球形体, 此时的球形体直径为5μ左右。

(二) 真菌原生质体分离

本试验选用粗糙链孢霉(*Neurospora crassa* AS 3.1604)的孢子制成孢子悬液, 其后用无菌刮铲涂布在加有无菌玻璃纸的Hagem培养基平板上, 25℃培养15h左右,

本文于1987年5月23日收到。

*中国农业科学院82级研究生。现址: 湖北武汉 中国农业科学院油料作物研究所。本项研究为国家自然科学基金资助课题。中国农科院土肥所微生物室谢应先、陈婉华同志参加了部分工作。

¹⁾蓝细菌(*Cyanobacteria*)原名蓝藻或蓝绿藻(Blue-green algae), 近年来由于发现其核酸组成和细菌相近, 同属于原核微生物而改称为蓝细菌, 但分类上仍保留原来藻类学名称。

挑起旺盛生长的幼嫩菌丝体,用0.5%蜗牛酶加0.6mol NaCl+0.05mol CaCl₂作稳定剂,放入一无菌的小三角瓶中在30℃水浴中酶解2h,即可游离出大量原生质体,终止酶作用后立即用缓冲液(0.6mol NaCl+0.05mol CaCl₂)稀释离心(500—1000rpm)收集浓缩的原生质体。此原生质体无色,圆球形,直径15—25μ,少数大于30μ。

(三) PEG引导摄取和融合

在无菌条件下,按1:1(V/V)的比例先吸取浓缩的链孢霉原生质体(10⁶—10⁷个/ml)0.5ml于一无菌离心管内,在室温下静置2—5min,然后吸取0.5ml粘球藻的单细胞或球形体(10⁸个/ml)于同一个离心管中,轻轻转动离心管,使二者充分混合均匀。静置5min后,沿管壁慢慢加入pH7.0 30%PEG融合剂(分子量6000),再轻轻转动离心管,使PEG与原生质体混合,置25—28℃水浴中保温30min,然后取出用高Ca²⁺高pH溶液稀释PEG,在500rpm下离心3—5min,去掉上层PEG,洗涤后再重新悬浮在高Ca²⁺高pH溶液中,随后立即制成水浸片在光学显微镜或倒置显微镜下观察链孢霉原生质体摄取或融合粘球藻情况。与此同时,对PEG的使用浓度,pH值以及作用时间等因素对融合和摄取的影响作了观察。对融合体的复壁时间、条件等作了短时期的观察。

结果和讨论

(一) 链孢霉原生质体对蓝细菌的摄取

在显微镜下直接观察原生质体对蓝细菌的摄取。粗糙链孢霉的原生质体本身是无色素的,当原生质体摄取了呈蓝绿色的粘球藻细胞后,在显微镜下易于识别它们;当移动原生质体时,被摄入的粘球藻

亦随之转动;在轻敲盖玻片时,粘球藻始终存在于原生质体中而不随水流移动。

通过观察,真菌原生质体对粘球藻摄取过程如下:单个菌体先附着在原生质膜上,在PEG作用下菌体压向质膜形成凹陷,然后穿过质膜进入到原生质体。被摄入的菌体均为去掉包被的单细胞,未发现不去包被的团聚菌体能被摄取。见图版I—1,2。

观察发现,真菌原生质体对粘球藻的摄取方式大致有2(图1):1.单个原生质体对粘球藻的“内吞”(Endocytosis)和“摄取”(Uptake)作用;2.几个原生质体之间的“细胞融合”(Cell fusion)作用。第二种是几个原生质体包围一个粘球藻,通过原生质体融合而将粘球藻包裹在一起,形成一个大原生质体。

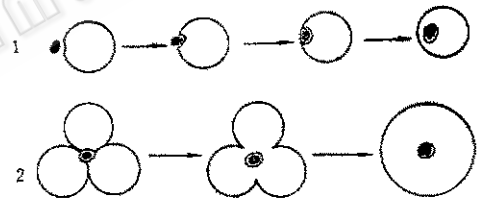


图1 原生质体摄取粘球藻的两种方式(示意图)

1. “内吞”其过程为:附着→进入→封包→摄取
 2. “细胞融合”其过程为:附着→细胞融合→摄取
- 图中黑球表示粘球藻单细胞,空圈表示粗糙链孢霉原生质体

融合剂PEG的pH值、浓度、不同洗脱液等因素对摄取的影响不同。结果表明,融合剂PEG的pH值以pH7—7.5为最好,过高(pH>8.5)或过低(pH<6.5)则对原生质的稳定性和摄取率有明显的影响;PEG的浓度则以30%为适,而原生质体的稳定性及摄取频率又与作用时间有关,作用时间短时,摄取频率低,处理30min为最好,超过40min以上原生质体则大量崩解。

融合剂、洗脱液的成分及浓度以无机盐(0.6mol/L NaCl+0.05mol/L CaCl₂;

或 0.5mol/L MgSO_4 为好，与之比较，如果使用甘露醇或山梨醇加蔗糖(0.5mol/L 甘露醇 + $0.5\text{—}0.6\text{mol/L}$ 蔗糖或 0.5mol/L 山梨醇 + 0.6mol/L 蔗糖)作为融合剂、洗脱液，则摄取或融合的效果明显不及前者。在前一种方法中，溶液中较多的阳离子 Ca^{2+} 、 Na^+ 、或 Mg^{2+} ，与原生质体表面的负电荷发生了强烈的作用。这种相互吸引的相反电荷促使了更多的原生质体的相互接触以至吞噬或融合在一起；同时这种溶液起到了另外一种作用，即稳定原生质体外的渗透压的作用。而在后一种方法中，高浓度的糖分只起到了稳定渗透压的作用。

将摄取了粘球藻的链孢霉原生质体重新悬浮在Hagem培养液中，培养12—20h原生质体即能恢复细胞壁，并且长出芽管。培养25h后，可见到粘球藻存在于芽管中(图版I—3)，但尚未能明确这是一种生长中的现象或真菌的排斥作用。

(二) 链孢霉原生质体和蓝细菌球形体的融合

用 0.5% 溶菌酶处理无包被的单细胞粘球藻1—1.5h后，90—95%的细胞能去壁。两种混合均匀的原生质体在PEG的作用下不断靠近，然后二者的质膜在接触处发生溶解，形成一个“8”字形融合体，二者的质膜进一步压缩，最后形成一个整体。有时可见到一方的原生质体全部流向另一方(图版I—4)。这种真正的细胞融合现象频率很低，约为 10^{-5} 左右。融合体在无氮培养液中继续培养15—20h后，还观察到有细胞质环流现象，这表明原生质体有活性，但未测定融合体的固氮活性。

实验结果还表明，粘球藻的球形体在无氮培养液中在 4°C 保存时，随着时间的延长而变得不稳定。保存5天后大约有10%破碎，但未见有复壁现象。在 20°C 时，5

—6天则几乎全部破碎。在 25°C 、 2500lx 光照条件下，破碎现象少，2—3天后可见到大多数重新恢复了细胞壁，继而产生了粘质包被。

(三) 讨论

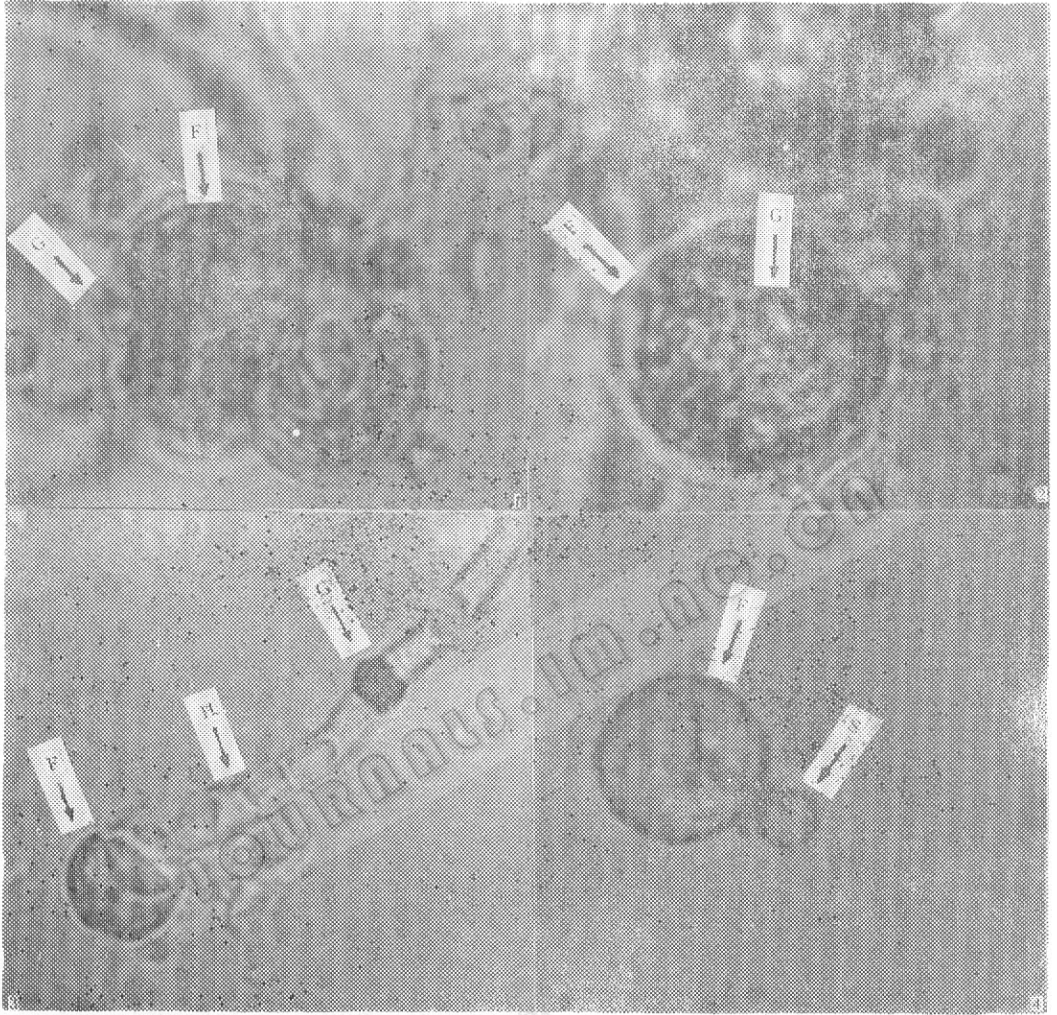
粗链孢霉摄取整体的粘球藻单细胞后又在恢复细胞壁过程中将其推至新的芽管中，这一方面说明粘球藻确已被摄入到链孢霉的原生质体中，另一方面说明二者似不能合二为一。单从摄取现象和照片来看，很象前人报道的玉米和烟草对粘球藻摄取情况^[5]。用粘球藻的球形体与链孢霉的原生质体融合，得到了类似两种植物之间细胞融合的现象，不过，其融合频率很低，大约只有 10^{-5} — 10^{-4} 。但足以说明这两种远缘生物的原生质体是可以发生融合的，通过二者及融合体的色泽变化过程得以判别。至于融合体是否能生存，是否能发生遗传物质的交换而稳定地遗传下去，还有待进一步探索。本实验所用融合剂的pH值和浓度要比前人报道的材料略低一些^[3,7]。

近几年来，有关引导固氮微生物进入真核细胞生物的研究方法发展迅速，且多种多样，目前还难以判断何种方法更好。在受体的选择上也是各自标新立异。然而在固氮基因供体的选择上，有些研究者以固氮蓝细菌为供体，这是因为此类细菌同时有光合和固氮作用；如能移植到缺乏叶绿素的真核细胞内，有可能建立新的光合共生固氮体系。其理论根据是：近代分子生物学已证实高等植物的叶绿体来源于原核光合生物(很可能是蓝细菌)。本研究中选用单细胞固氮蓝细菌粘球藻为固氮基因供体，在单个菌体中同时进行光合作用和固氮作用，而其细胞能防止氧对固氮酶钝化^[13]；此外，粘球藻不含有对高等植物细胞有害的毒素^[14]。因此，选用粘

球藻可能是用于此类研究的较好材料。

参 考 文 献

- [1] Dixon, R. et al., *Nature*, 260:268, 1976.
- [2] Cannon, F.C. and Postgate, J.R., *Nature*, 260:271, 1976.
- [3] Burgoon, A.C. and Bottion, P.J., *Journal of Heredity*, 67:223—226, 1976.
- [4] Meeks, T.C. et al., *Planta*, 139:55—60, 1978.
- [5] Bradley, P.M., *Physiol. Planta*, 46:293—298, 1979.
- [6] Bradley, P.M., *Naturwissenschaften*, 66:111—112, 1979.
- [7] Yamada, T. and Sakaguchi, K., *Agric. Biol. Chem.* 45:10, 1981.
- [8] Агафодорова, М.Н. et al., Доклады АН СССР, 265(3):758—763, 1982.
- [9] Агафодорова, М.Н. et al., Серия Биогическая, No. 4, 510—516, 1982.
- [10] Cooking, E.C., Tissue and Cultures bacterial nitrogen-fixation, In "Recent advances in biological nitrogen fixation", N.S. Subba Rao (ED) Arnold, E, p.301, 1980.
- [11] Giles, K.L. and Whitehead, H.C.M., *Sciences*, 193: 125—126, 1976.
- [12] Allen, M.M., *J. Phycol.* 4: 1—4, 1968.
- [13] Stewart, W.D.P., In *The Biology of Nitrogen Fixation*, Ed., Neeth Holland, Amsterdam, p.696—718, 1974.
- [14] Fogg, G.E. et al., *The Blue-Green Algae*, Academic Press, New York, 1973.



1. 示粘球藻细胞正穿过粗糙链孢霉原生质体膜进入原生质体内 ($\times 1800$) 2. 示粘球藻进入原生质体后随原生质环流运动 ($\times 1800$) 3. 示粘球藻存在于复壁后新长出的菌丝中 ($\times 1800$) 4. 示粘球藻和粗糙链孢霉发生原生质体融合的现象 ($\times 1600$)

图中, F 真菌原生质体; G 粘球藻细胞; H 重新长出的真菌菌丝; S 粘球藻球形体。