

藤仓赤霉菌丝体、原生质体及其融合的电镜观察

李武军 郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘要 描述了藤仓赤霉菌丝体、原生质体及其融合的超微结构,包括细胞壁、菌丝隔膜、核、内质网、脂质粒、排泄泡等。原生质体中 97% 为单核,大约 2.5% 为双核体。

关键词 藤仓赤霉,原生质体,融合

原生质体融合不仅为单核微生物育种和分子生物学研究提供了一条有利的途径^[1,2],在真核微生物如顶头孢霉、青霉等也有成功的例子^[3]。并有不少学者对一些原核微生物细胞原生质体的形成、再生和融合过程进行了电子显微镜观察,如链霉菌^[4,5]、枯草杆菌^[6]、棒状杆菌^[7]等,但很少见到有关真核微生物原生质体显微结构的研究报道。本文报道对藤仓赤霉菌丝体、原生质体以及营养互补的缺陷菌株进行原生质体融合时经过固定、脱水、包埋、切片、复染等处理后,透射电镜观察的结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

藤仓赤霉(*Gibberella fujikuroi*) 207, N44(Met⁻), N38(Lys⁻) 菌株^[8]。

1.2 培养基

斜面培养基、菌丝生长培养基等见文献报道^[8]。

1.3 原生质体制备及融合

见文献报道^[8]。

1.4 透射电镜样品制备^[10]

菌丝体加混合酶液消化后或作为亲本的二个缺陷型菌株的原生质体融合处理液,分别用 2.5% 戊二醛预固定,1% 锇酸后固定,系列乙醇浓度逐级脱水后用环氧丙烷渗透,再以 618# 环氧树脂包埋,LKB-3 型超薄切片机切片,以醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色,JOEL-100X I 型透射电镜进行观察。

2 结果

藤仓赤霉生长成菌丝体,从电镜照片可以看到菌丝宽度约为 2.6 μ m(电镜照片 14200 \times ,照片上的菌丝宽度为 3.5 μ m,由此推算菌丝体的实际宽度约为 2.6 μ m),有明显的菌丝隔膜并具有结构坚实的细胞壁(图版 I-1)。菌丝经混合酶液处理后,细胞壁被部分

或完全消化,电镜下显示二者均为球状体,前者直径约为 $2.5\mu\text{m}$,与菌丝体宽度相近,推测可能是菌丝体的横剖面切片,可见细胞壁被部分溶解的迹象;后者直径为 $4.5\mu\text{m}$ (图版 I-2,3),细胞核位于中央或偏于一侧,细胞质中含有大量的脂质粒,多分布于细胞质的周缘部位(图版 I-3)。在质膜内侧还可见大小不等形态各异的排泄泡,有的内含颗粒状物质,有的为空泡(图版 I-3,4)。拍摄到的大量单个原生质体照片(总共拍了 120 多个原生质体照片)基本上是单核的,但偶然可以发现极少数具有双核的原生质体(图版 I-4),大约一共找到 3 个,其比例约为 25%。原生质体融合始于质膜的接触,接触部位逐渐扩大以致达到膜的融合,继而造成异核、发生核质融合、基因交换以达到遗传重组(图版 I-5,6)。

3 讨 论

电镜照片显示经过溶菌的藤仓赤霉菌丝体产生包括细胞壁被部分溶解和完全溶解的二种球状体。真菌原生质体的特征之一是对渗透压的敏感性,即当置于低渗溶液中时将发生因“渗透休克”(osmotic shock)而使原生质体胀裂死亡。通常制成的原生质体制剂中总包含一部分对渗透压不敏感的个体。从电镜观察的结果推测,那些对渗透压不敏感的球状体可能与细胞壁未被完全去除有关。

由于赤霉素在农业上应用的良好效果,对产生菌的改良受到极大重视。但不论是诱变种还是重组育种,多核菌丝体造成技术上的极大困难。从本文的电镜观察结果表明,藤仓赤霉原生质体单核化程度高达 97% 以上,这无疑对这类多核菌丝体的遗传育种提供了一种极为有利的材料。对采用原生质体诱变^[9]及融合^[8]选育赤霉素高产变种取得成功的技术路线也是一种客观的论证。

对比二个单独的原生质体及二个原生质体融合后的大小,后者显然小于前者。这可能与融合液中存在的 PEG 作用有关。30%PEG4000 除了起到诱导融合的作用外,还可能在一定程度上提高了环境渗透压,把原生质体膜内水份吸出一部分致使质膜收缩,体积变小。可能这也是电镜照片中细胞质内含物显得模糊不清的原因(图版 I-5,6)。

致谢 王铮同志参加技术工作,高小彦同志协助电镜照片的拍摄及扩印,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Fodor K, Alföldi L. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1976, **73**:2147.
- [2] Hopwood D A. *Ann Rev Microbiol.* 1981, **35**:237.
- [3] Hamlyn P F, Ball C. Recombination studies with *Cephalosporium acremonium*. In: Sebek O K et al ed. *Genetics of Industrial Microorganisms*. Washington DC, 1978. 185-191.
- [4] Okanishi M. *J Gen Microbiol.* 1974, **80**:389.
- [5] Sagara Y, Fukin K, Ota F et al. *Japanese J Microbiol.* 1971, **15**:73.
- [6] Frehel C, Lheritier A, Sanchez-Rivas C et al. *J Bact.* 1979, **137**:1354.
- [7] 洪益国,郑幼霞,杨颐康. *微生物学报*, 1990, **30**(6), 475-476.
- [8] 李武军,郑幼霞. *微生物学报*, (印刷中).
- [9] 李武军,郑幼霞,王洪洲,等. *真菌学报*, 1992, **11**(3), 221-228.
- [10] 董渭祥,高小彦. *植物生理学通讯*, 1982, (5):32.

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF MYCELIA, PROTOPLAST AND FUSANT OF *GIBBERELLA FUJIKUROI*

Li Wujun Zheng Youxia

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

Abstract The ultrastructure of cell wall, mycelia septa, nucleus, endoplasmic reticulum, lipid globule, expulsion vacuole in the mycelia, protoplast and fusant of *Gibberella fujikuroi* were described. There are over 97% of monokaryons and 2.5% of bikaryons among the protoplast observed.

Key words *Gibberella fujikuroi*, Protoplast, Fusion

图版说明

Explanation of plate

1. 藤仓赤霉菌丝体(14200×); 2. 菌丝体细胞壁部分消化的球状体(14200×); 3. 单核原生质体(14200×); 4. 双核原生质体(14200×); 5. 原生质体融合体(20100×); 6. 二个原生质体融合初期(14200×)。

CW. 细胞壁; SP. 菌丝隔膜; N. 核; NL. 核仁; NM. 核膜;
 ER. 内质网; L. 脂质小球; V. 液泡; F. 膜融合。

1. Mycelia of *Gibberella fujikuroi*; 2. Cell wall partial digested spheroplast of mycelia; 3. Monokaryon protoplast; 4. Bikaryon protoplast; 5. protoplast fusant; 6. Early stage of two protoplast fusion.

CW. cell wall; SP. septa of mycelia; N. nucleus;
 NL. nucleolus; NM. nuclear membrane; ER. endoplasmic reticulum;
 L. lipid globule; V. expulsion vacuole; F. membrane fusion.