

坛紫菜原生质体的超微结构观察

王素娟 徐志东

(上海水产学院)

王光远 夏镇澳

(上海植物生理研究所)

在细胞与原生质体的分离培养与融合的研究中,利用电子显微镜观察高等植物细胞去壁情况、原生质体再生壁的形成过程以及原生质体融合后细胞内细胞器的变化已经是比较普遍采用的手段^[1,2,7]。但在大型海藻细胞分离与培养方面的研究工作中,利用这一手段进行研究的并不多见。

我们在研究 I^[4]中曾经利用海螺酶解离坛紫菜的营养细胞并成功地培养成紫菜叶状体,但是解离成单离细胞去壁情况如何,当时并没有进一步研究。但是原生质体的获得是进行细胞融合与遗传操作的先决条件,如果没有足够比例的原生质体,这两方面的工作是无法进行的,因此我们又进行了原生质体的分离与鉴别实验。分离工作是改单一的酶加纤维素酶,而鉴别工作则采用荧光增白剂与电子显微镜观察。观察坛紫菜营养细胞在实验中经酶解后去壁的情况、还观察了细胞内细胞器及其分布。这些观察结果既可提供紫菜细胞学的基础资料,而且也为进一步进行细胞融合提出处理技术上的依据。现将我们的观察报告如下。

一、材料和方法

试验材料采自福建晋江人工采苗养殖的网帘,当苗长3—10厘米时,将网帘晒干后放入冷库(-20℃左右)冷冻达半年之久(1983.11—1984.5)。试验前两天取出材料浸泡于消毒海水中,待幼苗散开后由苗绳上取下洗刷2次,静养2天;用消毒海水洗刷并剪切成小

块,用1mol/L的葡萄糖液冲洗去盐并过滤,然后将叶片小块放入1%海螺酶与0.5% Onozuka R.10纤维素酶的混合液中,于28—30℃下震荡摇动120rpm,酶解2小时左右。酶介结束用三倍于酶液的MES培养基稀释离心,收集的原生质体再用加盐MES培养基(0.2mol/L NaCl)洗涤离心3次,最后将收集的原生质体用MES培养基进行培养。取出少量原生质体用荧光增白剂检查脱壁情况,并将原生质体固定在2.5%的海水戊二醛固定液中,4小时后转移到磷酸缓冲液中,按电镜要求制成包埋块、切片染色,以H-500型电镜观察并拍摄照片。

二、观察结果

坛紫菜叶状体经酶解两小时后镜检见到绝大多数细胞已从叶片上脱离下来悬浮在酶液中(图版:1),经离心收集大多数的形状已由多角形变成圆形,个别为椭圆形和有两个粘连在一起的情况,粘连处平直。经荧光增白剂处理后,用荧光显微镜观察,大多数呈较强的红色、无绿色荧光反应,说明这些大多是无壁的原生质体;另外少数有较弱的荧光反应,说明少数原生质体外围尚留有残余的纤维素,去壁不完全(图版:2)。

电镜观察结果,去壁完全的原生质体外面是一层原生质膜(图版:3)。有时在原生质膜外面还可以看到有透明的絮状物质散在。对在光学显微镜下观察粘连在一起的两个细胞用

荧光显微镜检查粘连部分并不呈现绿色荧光反应，进而用电镜观察，发现粘连部分之间只有一层透明的物质，其结构与原生质膜外的絮状物质相似，可能是酶解细胞壁后的残余物质。

因此这种细胞不能成圆形仅保持椭圆形（图版：4—5）。

原生质体内的细胞器以色素体占据了中央大部分空间。色素体外包有被膜（图版：3），

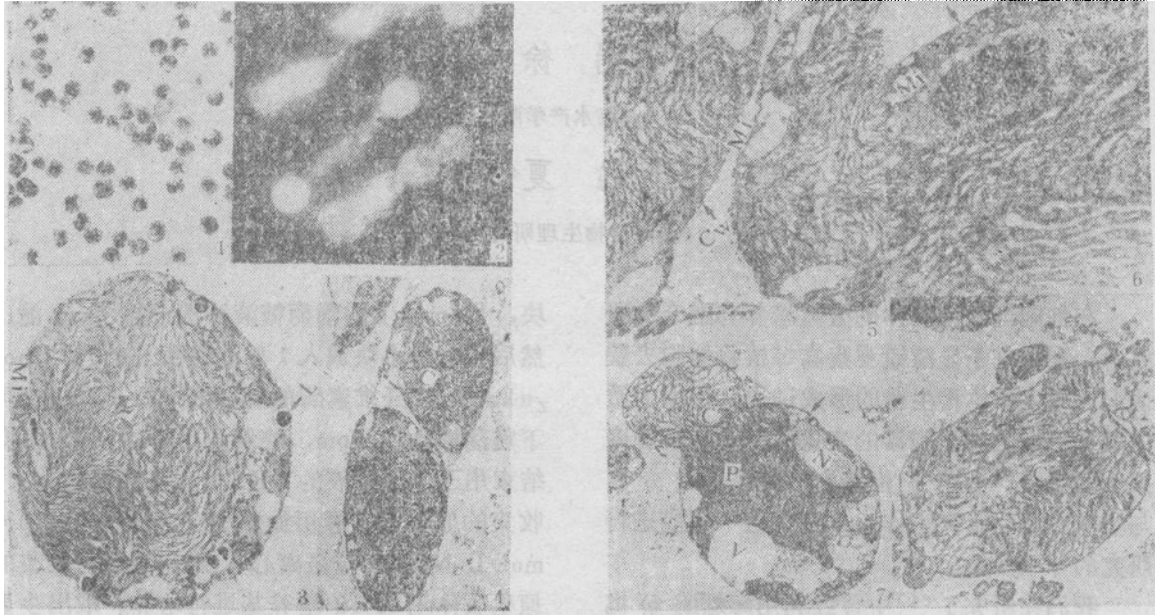


图 版¹⁾

C: Chloroplast色素体 Cw: Cell wall细胞壁 N: Nucleus细胞核

P: Pyrenoid蛋白核 V: Vacuole液胞 Mi: mitochondria线粒体 L: Lipid脂质体

1. 光学显微镜下观察分离的细胞与原生质体，其中有两个连在一起的细胞。×800
1. Isolated cell and protoplasts observed under light microscope twin cells can be seen among cells. ×800
2. 荧光显微镜示原生质体和有壁 of 的细胞。×1250
2. Observation with fluoroscope showing protoplasts and cells with cell wall. ×1250
3. 电子显微镜示原生质体，可见一大的星状色素体 (C)，中央为蛋白核 (P)，线粒体 (Mi)，脂质体 (L)，液胞 (V)，以及原生质膜外的絮状物。×8100
3. Electronmicrograph of protoplasts showing a large stellate shape chloroplast(C), a centrally located pyrenoid (P), mitochondria (Mi), Lipid (L), Vacuole (V) and fibrous material around outside of protoplasm membrane. ×8100
4. 电镜图示两个粘连在一起的细胞，连接部是透明的胞间物质。×4100
4. Electronmicrograph of two attached cells, showing the transparent intracellular material between two cells. ×4100
5. 图4的放大图象，示细胞连接部分，原生质膜清晰可见（箭头）。×13700
5. Magnification of fig. 4., showing the connected portion of two cells. The protoplasm membrane are visible clearly (arrow). ×13700
6. 图示原生质体内色素体，蛋白核，细胞核，线粒体等；箭头示原生质膜。×18000
6. Protoplast containing chloroplast, pyrenoid, nucleus, mitochondria, arrow shows plasma membrane. ×18000
7. 色素体正向原生质膜外流出，细胞核位近细胞壁侧位。×5000
7. The chloroplast is flowing out the protoplasm membrane, the nucleus is located near cell wall. ×5000
8. 单一色素体，示外包被膜。×9660
8. A single chloroplasts surrounded by an envelope. ×9660

¹⁾ 编者按：图版1—8均比原图缩小 $1/2$ 。

类囊体基本是平行排列的，但形成了各种方向的腕状突起，使色素体呈不规则的星状。中央为一大蛋白核。液胞位于原生质膜的外围，其数量与大小均可以影响色素体腕状突起的长短与多少。在原生质浓度液胞少的情况下，色素体腕状突起少。而液胞多时色素体腕状突起就多。图版：7 表示一个色素体自原生质膜处外流的情况，色素体外有一核和较多的液泡，这时色素体尚未呈腕状突起。当去壁的原生质体被破坏，剩下的色素体形状有变成圆形趋势，因液泡对其腕状突起的影响已不再存在（图版：8）。原生质体的核由于有色素体的存在，一般都位于细胞一侧，内有大的核仁（图版：6—7）。线粒体呈椭圆形，长宽约为 $1.0 \times 0.4\mu$ ，内膜形成的嵴清晰可见（图版：5—6）。在细胞内还观察到电子密度深的颗粒，从形状和结构看应是脂质体，图象中未见到红藻淀粉，原因有待继续研究。

三、讨 论

从分离坛紫菜的原生质体来看，它和原来营养细胞的内部构造基本相同，区别在于前者无细胞壁成圆形，后者带壁成多角形，两者均有一个大的星状色素体，蛋白核居于其中，色素体的腕状突起向四周伸出。液胞位于细胞膜周围。细胞核侧位，形状椭圆两端略细。我们的观察与 Cole 等（1975）、Kito（1978）的观察是一致的。在原生质体内不具有果孢子内存在的那种大小囊泡，而这种大小囊泡的多少是从营养细胞转变到繁殖细胞质变的标志之一，因此刚释放出的原生质体应当仍具有营养细胞的性质。

组成紫菜营养细胞壁的成分，据研究有葡聚糖和甘露聚糖^[6]以及蛋白质^[7]外，还含有纤维素，这在本试验中也得到进一步证实。但用酶解高等植物细胞壁的纤维素酶和果胶酶解离紫菜细胞壁效果很差，甚至不起作用，而只用海螺酶解离紫菜不加纤维素酶时也只能得到单离细胞（唐延林，1983）。可见紫菜细胞壁的组成是比较复杂的。本文用海螺酶和纤维素酶

的混合酶处理坛紫菜，经荧光显微镜和电子显微镜观察证明所获得的是原生质体，说明坛紫菜用海螺酶对解离单细胞是很有效的，但要获得原生质体还必须加纤维素酶或进行二次酶解。在图版 4，5 中两个细胞粘连在一起，可能是细胞刚完成细胞分裂阶段，两个新细胞之间的壁在组分上与完成分裂独立的细胞间壁有所不同，故在酶解所需的时间要长一些。从图版 5 看，这部分细胞间物质透明度大，没有象正常细胞壁那样具有一定走向的纤维状物质，因而酶解效果也表现不同。

关于色素体腕状突起的多少、长短与液胞的多少、大小有关，如果原生质饱满、液胞少，色素体的腕状突起就少。反之，液胞多色素体就具有较多的腕状突起。如果细胞膜被破坏，液胞不存在，色素体可趋向圆形，腕状突起可以减少，在细胞形状改变时，色素体形状亦随之改变。可见色素体的形状可以随着细胞生理状况的改变而改变，不是固定不变的，这点只有在电镜下才能够观察清楚。

参 考 文 献

- [1] 上海植物生理研究所细胞生理室译，1974。植物体细胞杂交参考资料，第一集。科学出版社。
- [2] 上海植物生理研究所细胞生理室译，1975。植物体细胞杂交参考资料，第二集。科学出版社。
- [3] 王素娟、徐志东，1984。坛紫菜生殖器官超微结构的研究。国际第十一届海藻学术讨论会论文集。第213—217页。
- [4] 朱仁华，1983。海螺酶解壁的研究。山东海洋学院学报13（4）：47—57。
- [5] 唐延林，1982。紫菜营养细胞和原生质体的分离和培养。山东海洋学院学报12（4）：37—50。
- [6] 夏镇澳等译，1983。W. 巴尔茨等编，植物组织培养及其在生物技术上的应用。科学出版社。
- [7] Cole, Kathleen and E. Conway, 1975. Phenetic implication of structural features of the perennating phase in life history of *Porphyra* and *Bangia* (Bangiophyceae, Rhodophyta), *Phycologia* 14（4）：239—245.

- [8] Frei, E. and R. D. Perston, 1964. Non cellulosic structural polysaccharides in algal cell walls. Association of xylan and mannan in *Porphyra umbilicalis*. Proc. R. Soc. Biol. 160: 314—25.
- [9] Hanc, L. A. and J. S. Craigie, 1969. Studies on the algal cuticle. J. Phycol, 5: 89—102.
- [10] Kito, H., 1978. Cytological Studies on genus *Porphyra*. Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab. No. 39—83.
- [11] M. Polne-Fuller, M. Biniaminov and A. Gibor, 1984. Vegetative propagation of *Porphyra perforata*. IIth International Seaweed Symposium. pp. 308—312.

ULTRASTRUCTURAL STUDY ON PROTOPLASTS OF
Porphyra haitanensis (BANGIOPHYCEAE, RHODOPHYTA)

Wang Sujuan Xu Zhidong

(Shanghai Fisheries College)

Wang Guangyuan Xia Zhenao

(Institute of Plant Physiology, Shanghai)

Abstract

The ultrastructure of protoplasts of *Porphyra haitanensis* (Bangiophyceae, Rhodophyta) is studied in this paper. Protoplasts of *Porphyra* were treated with enzyme mixture for two hours, followed by centrifugation. The enzyme mixture was composed of 1% sea snail digestive enzyme and 0.5% R-10 cellulase in 2 M glucose solution. Fluorescent microscope observation reveals that most of protoplasts obtained show no fluorescent reaction. The protoplasts were collected and fixed for the ultrastructural study. Observation under the electron microscope confirms that protoplasts have only one layer of plasma membrane surrounded without cell wall structure. The ultrastructure of protoplasts is similar to that of vegetative cells.