

金线莲一促生真菌原生质体制备和再生研究

张集慧 郭顺星 曹文琴 杨峻山 肖培根

(中国医学科学院 中国协和医科大学 药用植物研究所 北京 100094)

摘要: 从药用植物内生真菌中筛选到对植物生长有显著促进作用的粘帚霉属的一种真菌 (*Gliocladium* sp. 简称 Y 菌), 以它为出发菌株, 进行原生质体制备与再生条件的研究。将培养 48h 的 Y 菌菌丝体经过巯基乙醇处理 30min, 并用 1% 的纤维素酶和溶壁酶混合液于 28℃ 酶解 3h, 原生质体得率可达 2.14×10^7 个 / mL, 在含 0.5M 的甘露醇为稳渗剂的再生培养基上, 其原生质体的再生率可达 3.86×10^{-4} 。

关键词: 粘帚霉属, 原生质体, 制备

中图分类号: Q939.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (1999)-05-0321-03

PREPARATION AND REGENERATION OF PROTOPLASTS OF ONE FUNGUS ACCELERATING GROWTH OF *ANOECTOCHILUS ROXBURGHII*

ZHANG Jihui GUO Shunxing CAO Wenqin YANG Junshan XIAO Peigen

(Institute of Medicinal Plant, CAMS and PUMC, Beijing 100094)

Abstract: This paper studied the conditions of preparation and regeneration of one endophytic fungus (*Gliocladium* sp.) isolated from the medicinal plant. The mycelia was cultured for 48h and delt with Mercaptoethanol for 30min, then was enzymelysed for 3h at 28℃ by the mixture solution of Lywallzyme (1%) and Cellulase (1%). The forming number of protoplasts was 2.14×10^7 / mL, and the regeneration frequency was 3.86×10^{-4} .

Key words: *Gliocladium*., Protoplasts, Preparation

随着对药物需求量的不断增大, 药用植物资源正以迅猛的速度逐年减少, 人们正面临着异常严峻的资源危机。因此想方设法力争从不同的角度对这些濒临枯竭的珍稀药用植物加以有效的保护和扩大其资源已迫在眉睫。利用促进植物生长发育的内生真菌来提高这些植物的生长速度, 无疑给解决这个非常棘手的问题提供了一条创新性思路和途径。金线莲 (*Anoectochilus roxburghii*) 为名贵濒危药用植

物, 由于其生长缓慢, 药物需求量大, 乱采滥挖现象严重, 现存的金线莲资源已相当贫乏。为此, 我们从众多的药用植物内生真菌中, 筛选出粘帚霉属的一种真菌 (Y 菌) 对金线莲的生长具有显著的促进作用。考虑到 Y 菌具有较好的开发前景, 我们首先对其原生质体的制备和再生条件进行了探讨, 为今后进一步对该菌的诱变

收稿日期: 1998-08-26, 修回日期: 1999-03-20

育种、原生质体融合及分子调控的研究创造条件。

1 材料与方法

1.1 菌株

本文采用粘帚霉属 (*Gliocladium*) 的一真菌 (简称 Y 菌) 为出发菌株, 由本室提供。

1.2 试剂

纤维素酶 (中科院上海生物化学研究所), 蜗牛酶 (北京百泰生化技术公司), 溶壁酶 (广东省微生物研究所)。以上酶液以 0.5M 甘露醇配制。

稳渗剂: KCl, NaCl, 甘露醇, 蔗糖, 肌醇, 均为 0.5M。

0.1M Tris-0.1 MEDTA 溶液。

0.1M Tris-0.1 MEDTA 配制的 0.2% 巯基乙醇溶液 (简称 ME-TE)。

1.3 培养基及培养条件

1.3.1 培养基: (A): 麦麸培养基: 麦麸 30g (煮汁), 葡萄糖 20g, KH_2PO_4 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g, 加水至 1000mL 为麦麸液体培养基。上述组成中加琼脂 18~20g 为麦麸固体培养基。(B): 完全培养基: 土豆 100g (煮汁), 酵母粉 3g, 蛋白胨 5g, 葡萄糖 20g, KH_2PO_4 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g, VB_1 10mg, 琼脂 18g, 水 1000mL。(C): 再生培养基: 完全培养基中加入一定浓度的稳渗剂。

1.3.2 培养条件: 液体培养: 24℃, 摇床转速 140r/min; 固体培养: 24℃, 在恒温培养箱或者培养室中恒温培养。

1.4 原生质体的制备

挑取 Y 菌的斜面菌种至平板 A 培养基上, 24℃ 恒温培养 5d, 用打孔器 (ϕ 0.8cm) 在菌落表面打孔。挑取上述打好的平板菌片 1 片至摇瓶培养基 (A) 中, 并捣碎。摇瓶装量为 150mL/250mL (下同), 24℃ 摇床振荡培养一定时间后, 用 100 目孔径的铜网过滤, 收集菌丝, 依次以无菌水、0.1mol/L Tris-EDTA 冲洗菌丝, 并以 ME-TE 悬浮菌丝体, 处理 30min。铜网过滤收集菌丝, 0.5mol/L 甘露醇冲洗后, 离心取菌

丝沉淀, 并按 1:10 (菌丝重量 g: 酶液体积 mL) 的比例加入酶液, 28℃ 酶解, 500r/min, 离心 5min, 去掉菌丝碎段, 再以 3000r/min 离心 15min, 收集原生质体, 以 0.5mol/L 的甘露醇高渗液悬浮, 血球计数板计数。

1.5 原生质体的再生

取原生质体悬浮液 0.1mL 涂皿, 使每皿原生质体数达到 10^5 个, 在 24℃ 下培养 7d, 观察平皿中的再生菌落数, 计算再生率。

2 结果与讨论

2.1 原生质体制备

2.1.1 菌龄和酶种类对原生质体得率的影响: 由于丝状真菌的细胞壁组成较为复杂, 要获得较高的原生质体得率, 选择适宜的裂解酶系统非常重要, 使用微生物产生的酶复合体或者商品酶的混合液比单独使用一种酶液效果好^[1,2]。为此, 本实验中选择了 4 种混合酶液酶解菌丝体, 探索较适宜的酶液组成。

将 5 个菌龄 (24, 36, 48, 60, 72h) 的菌丝体和 4 种酶液 (如表 1 所示) 按照正交设计统计, 进行酶解, 制备原生质体, 并用血球计数板计数。

表1 四种酶液的组成

酶液	组成 (以 0.5M 甘露醇配制)
E1	0.3% (溶壁酶+蜗牛酶+纤维素酶)
E2	0.3% (溶壁酶+蜗牛酶)
E3	0.3% (溶壁酶+纤维素酶)
E4	0.3% (蜗牛酶+纤维素酶)

结果表明, 菌龄为 24h 时, 以 E1 的作用效果为最好。其余 4 个菌龄时, 都以 E3 的活性为最好, 而且菌龄为 48h 时, 在 E3 作用下, Y 菌原生质体得率达到最高值, 为 4.61×10^7 个 / mL。在菌龄为 60h 时, E2、E3 的原生质体得率相近, 为 3.79×10^7 个 / mL。

由此看出, 酶的作用受菌龄的影响, 幼嫩的菌丝体有利于酶的作用, 但并不是菌丝体的菌龄越小, 原生质体得率越高。原因可能是随着菌的生长, 菌丝体细胞壁的结构组成有所不同所致^[3]。

2.1.2 酶浓度对原生质体得率的影响: 将 E3 配

制成浓度为 2%、1%、0.5%、0.3%、0.1% 的溶液, 28℃ 酶解 Y 菌菌丝体。

结果表明, 酶液浓度从 0.1% 到 1% 之间, 随着酶液浓度的增加, 原生质体得率提高。在酶液浓度为 1% 时, 达到最高值, 2.14×10^7 个 / mL。至 2% 的浓度时, 降低为 1.39×10^7 个 / mL。可见增加酶浓度, 原生质体得率并没有继续增加, 相反酶浓度过高会造成原生质体变形, 效果不理想^[4]。

2.1.3 酶解时间试验: 适龄的 Y 菌菌丝体选用 1% 的 E3 酶解, 酶解时间为 1、2、3、4、5h, 定时取样。按照原生质体的制备方法收集原生质体。

结果表明, 酶解时间从 1h—3h, 随着酶解时间的延长, 原生质体得率逐渐增加, 3h 时达到 9.28 个/mL, 3h 以后开始减少。因此 Y 菌的最适酶解时间为 3h。可见延长酶解时间, 原生质体得率并没有继续增加, 这是由于酶解时间过长, 对于一些早期释放的原生质体膜有破坏作用, 影响了原生质体膜的稳定性。导致原生质体破碎, 即使不破碎也会使其活力下降, 再生率降低^[5]。此外, 时间过长溶壁酶等对原生质体也有不利作用, 酶解完毕后, 应尽快将酶液除去。

2.1.4 稳渗剂试验: 分别采用 0.5mol/L KCl、0.5mol/L 甘露醇作溶剂配制酶液, 酶解菌丝体, 制备原生质体, 结果如表 2 所示。

表2 不同的稳渗剂对原生质体得率的影响

稳渗剂	Y 原生质体得率 ($\times 10^{-6}$ 个 / mL)
0.5mol/L KCl	2.08
0.5mol/L 甘露醇	6.07

稳渗剂的性质和浓度不仅对维持渗透压平衡至关重要, 同时对原生质体释出也有很大影响。从表 2 中可以看出, 用 0.5mol/L 浓度的甘露醇和 0.5mol/LKCl 分别作稳渗剂, 原生质体得率相差很大, Y 菌在 0.5mol/L 甘露醇作稳渗剂时, 原生质体得率较高。可能是由于酶对于一些金属离子的加入 (如 K^+ 、 Cl^- 等) 更为敏感。因此, 选择适当的稳渗剂, 可以提高原生质

体得率。

2.2 原生质体的再生

不同稳渗剂对原生质体再生的影响: 分别采用 0.5mol/L KCl、0.5mol/L NaCl、0.5mol/L 蔗糖、0.5mol/L 甘露醇、0.5mol/L 肌醇作为稳渗剂加入到完全培养基中, 将原生质体分别稀释成 10^6 和 10^5 个 / mL 的浓度, 吸取 0.1mL 于再生培养基上, 涂皿、培养, 计算再生率。原生质体再生率 = (高渗平板上的再生菌落数—低渗平板上的菌落数) / 显微观察的原生质体数 $\times 100\%$ 。

结果表明, 在以 0.5mol/L 的甘露醇为稳渗剂的再生培养基上, Y 菌的原生质体再生率较高, 为 0.039%。而在 0.5mol/LKCl、0.5mol/L NaCl 的再生培养基上, Y 菌的原生质体不仅再生率低, 而且生长速度也大大低于在其余三种稳渗剂条件下的生长速度, 同时在这两种培养基上, 菌落也极易变为粉色。因此, Y 菌的再生培养基选择 0.5mol/L 甘露醇作稳渗剂。

渗透压稳定剂作用很大, 不仅可以维持渗透压平衡, 同时还应注意它是否会加重原生质体的损伤或者抑制细胞壁的合成^[6]。

由于丝状真菌的细胞壁组成较为复杂。因此要获得大量的、活力较高的原生质体, 选择适宜的制备和再生条件非常重要。通过以上实验, 确立了 Y 菌的原生质体制备和再生较为优化的条件。为今后进一步改良菌种奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Eyssen H. Agriculture, 1977. 25:21~44.
- [2] 何慧霞, 朱平, 李焕炎. 真菌学报, 1996, 15(1): 215~219.
- [3] J F Perberdy In Microbial and plant protoplasts. Academic Press London, 39~50.
- [4] 曹文岑, 郭顺星, 徐锦堂等. 菌物系统, 1998, 17(1): 51~56.
- [5] 朱宝成, 王俊刚, 成亚利等. 微生物学通报, 1994, 21(1): 15~18.
- [6] 衣向群, 吴正铠, 包建中. 微生物学通报, 1990, 12(1): 76~80.