

廖汉泉 邱景芸 吴月嫦

(广东省微生物研究所, 广州)

**摘要** 在适当的酶解条件下, 用溶壁酶 (Lywallzyme) 酶解新鲜的草菇菌丝获得了大量的原生质体。分离出来的草菇原生质体形态正常, 质膜清楚, 有活力。原生质体通过悬滴培养和浅层培养均能再生成菌丝, 其中, 悬滴培养的再生频率为 2—5%, 浅层培养的再生频率为 7—10%。

**关键词** 草菇菌丝; 原生质体; 分离; 再生; 溶壁酶 (Lywallzyme); 渗透压稳定剂 (稳渗剂)

原生质体融合作为遗传育种的一种手段是本世纪七十年代初期新兴起来的一门科学技术。虽然它与遗传育种的其它方法相比显得非常年轻, 但由于它在生物科学的理论研究和生产实践上开辟了一个崭新的领域, 因而, 引起许多国家的生物科学工作者, 特别是遗传育种工作者的高度重视。为了培育食用真菌的优良新品种, 从而促进食用菌生产的发展, 我们试图利用原生质体融合这一手段进行食用真菌的遗传育种工作。为此, 首先必须获得有再生能力的食用菌原生质体。然而, 尽管对酵母菌和霉菌等真菌原生质体的分离和再生, 不少学者进行了许多研究<sup>[1-4]</sup>。迄今为止, 国内外在这方面的报道还很少, 本文主要报道利用一种自制的溶壁酶 (Lywallzyme) 分离草菇菌丝原生质体, 并将原生质体再生成菌丝的条件和方法。

### (一) 原生质体的分离

1. 菌丝生长培养基 (g): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 磷酸二氢钾 3, 硫酸镁 1.5, 维生素 B<sub>1</sub> 0.1, 水 1000ml, pH6.0。

2. 菌丝的培养: 以三角烧瓶, 装上适量菌丝生长培养基, 接入草菇 (*Volvariella volvacea*) 菌种, 然后置 35℃ 温箱液体浅层培养 45—51 小时。

### 3. 原生质体的分离条件与方法:

③ 分离条件: 溶壁酶液浓度为 1.5%, pH 自然 (6.2); 渗透压稳定剂 (稳渗剂) 为 0.4M KCl; 酶解温度为 34—35℃; 酶解时间为 1.5 小时。

② 分离方法: 将培养好的草菇菌丝用无菌水洗滌后, 以镍丝网过滤得鲜草菇菌丝。然后以一定量的草菇菌丝放入适量的酶液中, 在上述分离条件下进行酶解。酶解后用脱脂棉过滤, 再离心 (1000r/min, 10 分钟) 得乳白色的原生质体, 最后用稳渗剂稀释为适当浓度的原生质体悬液。

用 5ml 酶液酶解 0.7—1.0g 鲜草菇菌丝, 其原生质体浓度一般可达到  $1.5 \times 10^6$ — $2.2 \times 10^6$  个/ml。所产生的原生质体形态正常、质膜清楚、极少变形 (图版 I-1)。

### (二) 原生质体的再生

1. 原生质体再生培养基 (g): 马铃薯 100, 蔗糖 15, 硫酸铵 4, 磷酸二氢钾 2, 硫酸镁 1, 氯化钾 29.8, 维生素 B<sub>1</sub> 0.1, 水 1000ml, pH6.0。

2. 原生质体悬液的制备: 用上述原生质体分离方法获得草菇菌丝原生质体后, 再将原生质体用稳渗剂和再生培养基各洗涤一次 (洗后均以 1000r/min 的速度离心 8—10 分钟, 收集原生质体), 最后用原生质体再生培养基稀释为适当浓度的原生质体悬液。以上操作均在无菌条件下进行。

### 3. 原生质体的培养:

① 悬滴培养: 在  $\phi 9$ cm 的培养皿底垫上一块滤纸吸水保湿, 然后放上若干直径约 1.5cm 的玻璃圈。将制备好的原生质体悬液滴加在盖玻片上, 使液滴朝下悬在盖片上, 然后置于玻璃圈上, 使每个玻璃圈成一培养小室, 再盖上培养皿盖, 并用透明胶纸密封, 或把整个培养皿放入

另一较大的培养皿内,置于35℃下作悬滴培养。

② 浅层培养: 吸取0.1ml制备好的原生质体悬液,注入已装有0.9ml原生质体再生培养基的试管( $\phi$ 2cm)内,然后置于35℃下培养。

以上操作均在无菌条件下进行。

4. 原生质体再生频率的计算: 培养前在显微镜下计算10个视野的原生质体总数,培养适当时间(悬滴培养20—23小时,浅层培养24—27小时)后计算相同视野的出芽原生质体总数,计算出原生质体再生成菌丝的频率。

原生质体再生频率(%)

$$= \frac{\text{培养后10个视野的出芽原生质体数}}{\text{培养前10个视野的原生质体数}} \times 100$$

用两种培养方法经过多次培养试验,均能得到草菇原生质体的再生菌丝(图版I-2)。其中,悬滴培养的再生频率为2—5%,浅层培养的再生频率为7—10%。

### (三) 讨论

1. 各分离条件对草菇菌丝原生质体分离的影响:

① 菌龄与菌丝量,菌丝的菌龄和酶解的菌丝量对原生质体的产量影响很大。我们曾用不同菌龄的草菇菌丝在同样的条件下酶解,结果是较嫩的菌丝所得的原生质体明显较多。这与许多霉菌菌丝的原生质体分离情况相似<sup>[4]</sup>。但是,菌丝培养时间在适当的范围内,则菌龄对原生质体的产量影响不大。这时,用来酶解的菌丝量则显著影响原生质体的产量。

② 酶的浓度:使用本溶壁酶分离草菇菌丝原生质体,虽然用各种不同的浓度均可获得原生质体,但通过多种浓度的酶解对比试验,在分离草菇菌丝原生质体中,以选用1.5%的酶浓度较为适宜。酶浓度太高反而易使原生质体变形,甚至破裂,太低则使酶解时间太长或原生质体产量下降。

③ 渗透压稳定剂(稳渗剂),在分离原生质体中,渗透压稳定剂是很重要的一个因素。稳渗剂的种类和浓度对原生质体的分离影响极

大。为了找到较适宜的稳渗剂种类及其浓度,我们曾选用氯化钾、硫酸镁两种无机盐和蔗糖、甘露醇作稳渗剂对草菇菌丝做过大量的酶解对比试验,结果用0.4M的氯化钾作稳渗剂时所得的原生质体最多,而且形态也较好。硫酸镁和甘露醇次之,蔗糖最差。以0.5M的硫酸镁作稳渗剂时,我们发现所得的原生质体特别大。据报道<sup>[2,4]</sup>,无机盐作渗透压稳定剂,对丝状真菌分离原生质体总是最有效的。我们的试验进一步证实了这种观点。

④ 酶解温度,分离原生质体时所用的酶解温度对原生质体的分离也有一定的影响。我们曾在31—38℃范围内对草菇菌丝进行酶解试验,结果证明,分离原生质体效果较好的温度是34℃和35℃。在这两种温度下酶解草菇菌丝时,获得的原生质体不仅数量多,而且极少变形。当酶解温度低于33℃时,原生质体虽然极少变形,但数量显著减少。而当酶解温度达到36℃或高于36℃时,则变形的原生质体明显增加,特别是38℃酶解时,不仅原生质体变形较厉害,而且数量也反而减少。

⑤ 酶解时间,通过多种酶解时间的对比试验,以酶解1.5小时较为适宜。酶解时间太短,原生质体未充分释放;酶解时间太长,则所得原生质体不仅变形较多,而且数量也反而少了。这可能是由于酶解的时间较长导致了较早出来的原生质体破裂所致。

⑥ 酶液的pH,酶液的pH也明显地影响草菇菌丝原生质体的分离。我们曾选用5.6、5.8、6.0、6.2(自然)、6.4、6.8等多种不同pH的酶液对草菇菌丝作酶解对比试验,对比的结果是酶液的自然pH(6.2)最适宜。将配好的酶液用酸或碱把pH调低或调高均对原生质体的分离不利。同时,我们还明显地看到一个规律,即当酶液的pH比自然pH低些时,对原生质体的分离影响不大,但当酶液pH比自然pH高些时,则显著地影响酶解效果,不仅使原生质体数量大大减少,而且使原生质体变形较多,甚至破裂。

⑦ 菌丝的生理状态,我们在分离草菇菌丝原生质体的大量酶解试验中发现,用来分离原

生质体的菌丝的生理状态是影响原生质体分离的一个极其重要的因素。这与其它丝状真菌分离原生质体时所报道的情况<sup>[2,3]</sup>是一致的。我们发现在菌龄和其它培养条件都基本相同的情况下培养出来的草菇菌丝,在完全相同的条件下酶解,原生质体的产量有时差别很大。这可能是由于环境和培养基成分的微小变化影响细胞的生理状态,从而引起细胞壁成分的变化所致。其机制有待进一步探讨。

## 2. 草菇菌丝原生质体再生的一些问题和现象:

① 对于菌丝原生质体的再生,目前还没有专用的培养基。本试验所用的再生培养基只是对菌丝生长培养基作适当改良而成,可将草菇原生质体再生成菌丝。要得到较好的原生质体再生培养基,有待进一步改进。据报道,在植物原生质体再生中,原生质体培养基一般减少碳源含量较有利<sup>[1]</sup>。

② 关于悬滴培养和浅层培养,从我们的初步试验来看,原生质体在悬滴培养中的再生速度比浅层培养的快。悬滴培养一般 20—22 小时可见出芽,有时 14 小时便可见到出芽的原生质体。而浅层培养一般要培养 24—27 小时才见到原生质体出芽。这可能与通气条件不同有关。

③ 草菇菌丝的原生质体在培养过程中,有不少膨大,形成圆形、椭圆形、哑铃形或噬珠形

等多种不同的形状,同时,还可见到里面有一个或几个大液泡。这种原生质体多数不能长出菌丝。膨大的原生质体最大的直径可达 50—70 $\mu$  (一般为 25—40 $\mu$ )。出芽的原生质体一般不膨大或膨胀得很少。每个原生质体可长出 1—3 条菌丝。同时,还可见到两个或多个原生质体融合的现象。

④ 本试验中原生质体的再生频率较低,这可能与下面几种因素有关: (i) 原生质体再生培养基成分不很适宜; (ii) 原生质体培养条件不佳; (iii) 原生质体的分离条件不适; (iv) 用来分离原生质体的菌丝生长时期和菌丝的部位不当。此外,对不同的真菌,其原生质体的再生频率也是大不相同的<sup>[3]</sup>,有的较高,有的本来就低。有人认为原生质体胞壁的再生与核行为有关<sup>[3]</sup>,所以,若分离到无核原生质体较多的话,也会降低原生质体的再生频率。

## 参 考 文 献

- [1] 黄祥辉: 植物生理学通讯, 1: 22—30, 1981。
- [2] J. F. Peberdy: *Ann. Rev. microbiol.*, 33: 21—39, 1979。
- [3] J. F. Peberdy: *Enzyme and Microbiol. Technol.*, 2 (1): 23—29, 1980。
- [4] J. F. Peberdy: *Isolation and Properties of protoplasts from filamentous fungi*. Microbial and plant protoplasts, Academic press, London, New York, San Francisco, 39—50, 1976。