

食用菌原生质体巨大化及其再生的初步观察

周伏忠 贾身茂

(河南省科学院生物研究所, 郑州 450003)

李秀玉

(北京农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 通过观察几种食用菌原生质体的巨大化过程, 发现含有细胞壁裂解酶的高渗营养液是比较理想的巨大化反应液; 巨大化反应不同时间的原生质体再生率有“高→低→高”的起伏变化; 巨大化后原生质体再生率普遍提高。最后测定了巨大化时间、渗透压稳定剂、培养基及其碳源等对巨大化原生质体再生率的影响。

关键词 香菇, 平菇, 原生质体巨大化, 巨大化原生质体的再生

近 20 年来, 包括原生质体融合在内的原生质体制备、再生及其融合系统的建立。原生质体诱变的应用以及原生质体的单核化技术等原生质体技术在食用菌领域中得到了广泛开拓。真菌原生质体与植物原生质体相比, 直径一般

仅有 $4\sim 10\mu\text{m}$, 因此它在融合中的接触面积减少了, 也不利于细胞融合子的显微单孢分离技术的推广应用。在真菌原生质体的酶解释放和

1994-04-25收稿

液体再生培养过程中,时常发现原生质体的增大与液泡化现象,即原生质体的自发巨大化。但一般认为这是一种异常现象,未引起足够的重视^[1~3]。然而,1985年,Wakabayashi等^[4]将白黄侧耳(*Pleurotus cornucopiae*)原生质体在含有细胞壁裂解酶的高渗缓冲液中巨大化65h,发现其再生率提高6倍,并实现了巨大化原生质体的种内电融合^[12]。本文对几种食用菌的巨大化现象进行了观察,改变了巨大化反应条件,并实现了巨大化原生质体的再生,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:香菇 S-9 和 Cr02;猴头 H11;佛罗里达侧耳。

1.1.2 培养基:GM 培养基(%):葡萄糖 2.0,蛋白胨 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, KH_2PO_4 0.05, CaCO_3 0.01;VB₁ 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

PD(%):土豆浸出液 20,葡萄糖 2.0。

WJ:大麦糖化后的麦芽汁(16°,燕京啤酒厂生产),用蒸馏水稀释成8°、4°使用。

上述培养基内加入1.5%琼脂做固体培养基使用;加0.6mol/L或0.7mol/L甘露醇、 MgSO_4 或NaCl做高渗培养基使用;均做 $1 \times 10^5\text{Pa}$,20min高压灭菌。

1.1.3 酶:溶壁酶(广东微生物所生产);蜗牛酶(中科院生物物理所生产);纤维素酶(上海东风试剂厂生产)。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的制备与再生:见文献[9]。

1.2.2 原生质体的巨大化及再生:取分离纯化的原生质体1ml,放入含有细胞壁裂解酶的高渗营养液中,25℃培养,每天轻轻摇动1~2次。巨大化原生质体用界面法收集,方法是:将5~8ml巨大化原生质体的酶溶液,加入离心管底部,在液面上小心放置3~5ml 0.6mol/L NaCl溶液,2000r/min \times 10min,三次;离心后吸取两种溶液交界处的原生质体,即得纯化的巨大化原生质体。巨大化原生质体的再生及再

生率计算方法与正常原生质体相同。

1.2.3 原生质体巨大化反应及其液体再生的显微观察:于不同时间取高渗营养液中发生巨大化的原生质体溶液1滴于载玻片上,或于不同时间取液体再生液(高渗)中的巨大化原生质体1滴于载玻片上,加入4 μl 0.1%VBL型荧光增白剂(上海助剂厂生产),封片后用荧光显微镜(紫外激发光)观察原生质体的巨大化反应或巨大化原生质体的液体再生。

2 结果与讨论

2.1 原生质体的巨大化反应过程

在改良条件下(用高渗营养液GM、PD或WJ替代高渗缓冲液)原生质体巨大化反应试验观察发现:不论是香菇、猴头双核菌丝的原生质体,还是香菇单核菌丝或香菇、佛罗里达侧耳的担孢子的原生质体都能发生不同程度的巨大化;三种细胞壁裂解酶(溶壁酶、蜗牛酶、纤维素酶)及三种高渗营养液(GM、PD、WJ)都能有效的促进原生质体的巨大化反应。巨大化后的原生质体直径普遍伸长,可达25.00 μm (如香菇S-9双核菌丝的原生质体,72h),甚至35.00 μm (如香菇Cr02担孢子的原生质体,72h)(图1,图2),是巨大化前的7倍之多(表1)。随着巨大化反应时间的增加,参与巨大化反应的原生质体数量越来越少(表2)。这其中可能有部分低活力原生质体的破裂死亡,也可能有部分原生质体的自发融合的原因,因为在多次巨大化反应中都观察到巨大化原生质体的自发融合现象的发生。巨大化原生质体的产生,Peberdy^[11]认为是硫酸镁作用引起的。Wakabayashi等^[4]将之归功于“Onozuka”RS纤维素酶。曾荣鉴^[5]将之归功于溶壁酶的作用。本人认为上述理由是不全面的,原生质体内在的因素才是巨大化反应的主要原因,而外在因素除酶的去壁作用外,渗透压稳定剂、营养成分、无机盐配比、pH值以及生长调节因子等,都应该是巨大化反应的影响因素。1992年曾荣鉴等^[5]报道,酶系统对巨大化原生质体的百分率有一定影响。本实验发现,香菇S-9双核菌丝的原生质体在以

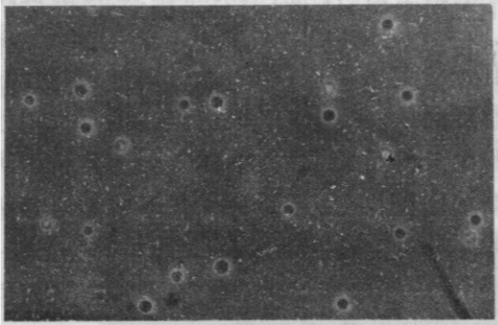


图1 香菇 Cr02 担孢子制备出来的新鲜原生质体 (Leitz, 40×3.2)

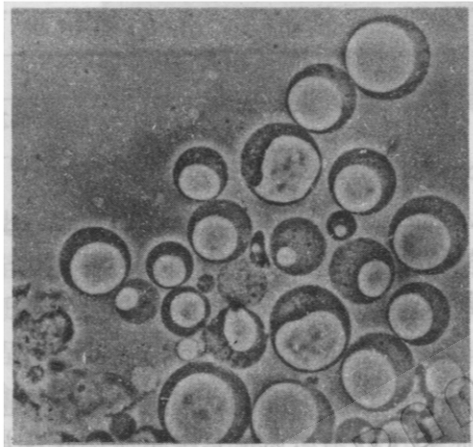


图2 香菇 Cr02 担孢子的原生质体, 巨大化 72h(同图1)

表1 几种食用菌原生质体的巨大化反应

(单位: μm)

原生质体	巨大化时间 (h)			
	0	24	48	72
Cr02 担孢子	4.50	9.45	21.50	30.20
S-9 担孢子	4.75	6.50	11.50	17.07
H11 双核菌丝	4.80	8.20	16.30	25.40

注: 表中数字为 20~30 个随机观察的原生质体的平均值。巨大化反应液为 GM+0.7mol/L 甘露醇(Cr02)或 0.6mol/L 蔗糖(S-9)或 0.6mol/L MgSO_4 (H11)+0.5%混合酶液(0.25%溶壁酶+0.125%蜗牛酶+0.125%纤维素酶)

0.6mol/L MgSO_4 做渗透压稳定剂时 72h 的巨大化原生质体百分率为 6%, 而以 0.6mol/L 甘露醇做渗透压稳定剂时则为 36%。这方面工作有待于进一步的深入研

究。

表2 佛罗里达侧耳原生质体的巨大化反应及其再生

巨大化时间 (h)	0	20	40	64	88
* 原生质体直径 (μm)	4.50	7.75	15.75	22.00	24.88
巨大化百分率 (%)	100	14.29	6.43	2.86	0.07
固体平板再生率 (%)	24.63	20.00	25.60	32.50	1.70

注: 原生质体制备酶解条件: 33℃, 100r/min, 5h, 担孢子即 100%转化为原生质体。再生培养基为 GM+0.6mol/L 甘露醇。巨大化反应液为 GM+0.7mol/L 甘露醇+0.375%溶壁酶+0.125%蜗牛酶

* 20 个原生质体的平均值

表3 S-9 双核菌丝的巨大化与非巨大化原生质体的再生率比较 (%)

再生培养基	新制备原生质体	0.7mol/L 甘露醇, 72h	0.6mol/L MgSO_4 , 72h
GM	0.0176	0.0417 (2.4)	—
WJ (4°)	0.0146	0.1667 (11.4)	—
WJ (8°)	0.0061	0.1167 (19.1)	0.050 (8.2)

注: 括号内数字为巨大化原生质体再生率比正常原生质体提高的倍数, 巨大化反应液为 GM+0.5%纤维素酶

2.2 巨大化原生质体的再生

初步实验结果表明, 巨大化原生质体的再生率有明显提高(表 3)。提高幅度因再生培养基及渗透压稳定剂的不同而异: WJ 好于 GM, 0.7mol/L 甘露醇好于 0.6mol/L MgSO_4 。进一步实验发现: 巨大化原生质体的再生率随着巨大化时间的延长有“先低后高”的现象。例如, 佛罗里达侧耳由 24.63% (0h)→20.00% (20h)→25.60% (40h)→32.50% (64h); 香菇由 1.95% (24h)→0.51% (48h)→1.19% (72h) (表 2、表 4)。再如, 香菇 S-9 担孢子的原生质体巨大化 24h、72h 后再生率的变化由 0.179% (0h)→0.059% (24h)→2.9% (72h)。这种规律性的“高→低→高”的变化可能预示了原生质体转化感受态(competence)的存在(当然也有例外,

在佛罗里达侧耳的另一单独实验中原生质体再生率从一开始就下降)。从表 2 可以看出,佛罗里达侧耳巨大化反应 88h 时原生质体数量和再生率都骤减,这一现象可能反映了原生质体内膜系统极限的到来或细胞核与细胞质体积比极限的到来^[11,13]。一般而言,65~72h 的巨大化时间对再生是比较理想的。从表 3、表 4 结果看出,再生培养基及其碳源、渗透压稳定剂对巨大化原生质体的再生都有一定的影响;以

WJ(4°)、0.7mol/L 甘露醇、葡萄糖较为理想;而 GM、0.6mol/L NaCl、蔗糖较差。表 4 中有一个数字偏低(画*号处)的原因是:显微观察证明,在该固体平板(较软)内有大量处于细胞团分裂阶段的“再生体”,荧光染色表明已有新细胞壁再生,可能是灭菌形成的培养基内的某些有害物质阻止了这些“再生体”的进一步再生,因此影响了该数据的准确性。从而也反映出再生培养基尚不理想。

表 4 Cr02 担孢子的巨大化原生质体的再生

(单位:%)

巨大化时间 (h)	再 生 培 养 基							
	0.6mol/L MgSO ₄				0.6mol/L NaCl			
	D	M	S	C	D	M	S	C
24	2.90	1.95	0.88	1.68	<10 ⁻³	0.022	<10 ⁻³	0.00625
48	0.65	0.51	0.31	0.41	<10 ⁻³	<10 ⁻³	0.00125	<10 ⁻³
72	0.55*	1.19	1.09	1.04	—	—	—	—

注: D: 葡萄糖; M: 麦芽糖; S: 蔗糖; C: 纤维二糖。再生培养基为 GM+20%土豆汁。巨大化反应液为 GM (0.6mol/L MgSO₄, pH5.0)+0.25%溶壁酶+0.125%蜗牛酶+0.125%纤维素酶

* 该数字可能有偏差(偏低),其原因见正文

2.3 原生质体的巨大化反应过程及其液体再生的显微观察

观察结果表明:随着巨大化反应时间的延长,原生质体直径不断增加;不同的原生质体发生巨大化的时间是不同步的,巨大化同一时间有不同大小的原生质体同时存在,这反映了不同原生质体之间存在着个体差异(图 2)。原生

质体中液泡的直径随着巨大化时间的延长也不断增加;巨大化原生质体易聚集成堆并自发融合;一般认为液泡化是细胞衰老的一种表现,如何改善巨大化反应条件来消除原生质体中的液泡是今后工作的重点。巨大化原生质体在高渗再生液中 24h 时已能看见有细胞壁物质在原生质较浓处的原生质体膜外面生成(图 3)。



图 3 香菇 Cr02 担孢子的巨大化原生质体(72h)的再生 24h 的情形 (OLYMPUS, 40×8.7 暗视野)

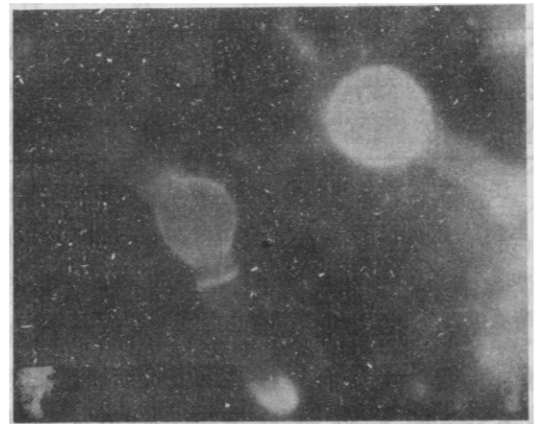


图 4 香菇 Cr02 担孢子的巨大化原生质体(72h)的再生 48h 的情形(同图 3)

48h可见部分直径较小的原生质体首先长出菌丝,此时的菌丝尚未分枝(图4);原生质体个体之间的再生程度也是有差异的;96h时可见到三种情况:①菌丝直接从原生质体再生并有分枝。②由于液体的流动性使细胞壁物质在原生

质体一端堆集,拖成长尾巴,而这些含有大液泡的原生质体在条件合适时(如固体再生培养基等)是可能有再生出菌丝的能力的。③原生质体发生皱缩或破裂,与所分泌的再生细胞壁发生质壁分离而死亡(图5-AB)。总之,食用菌巨

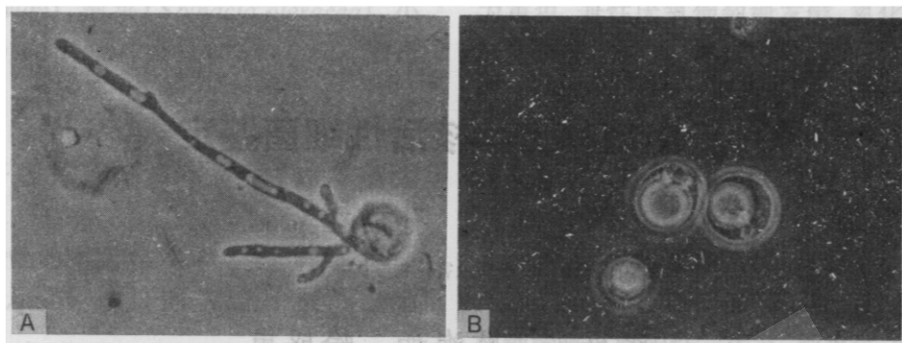


图5-AB 香菇 Cr02 担孢子的巨大化原生质体(72h)的再生 96h 的情形(OLYMPUS, 40×8.7)

大化原生质体的探索是有积极意义的;本人认为至少有三方面的意义:①纯化浓缩高活力原生质体并提高再生率^[6];②研究原生质体融合过程和原生质体转化感受态;③对于产厚垣孢子的食用菌如猴头来讲,原生质体经过巨大化反应有可能排除厚垣孢子对原生质体再生的影响。

参 考 文 献

- [1] JF Peberdy. *Anne Rev Microbiol.* 1979, 33: 21~39.
- [2] 廖汉泉. *微生物学通报*, 1987, 14(1): 1~3.
- [3] 陈漱澍, 曹军卫. *真菌学报*, 1986, 5(2): 117~123.
- [4] S Wakabayashi, Y Magae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1985, 21: 328~330.
- [5] 曾荣鉴, 马爱民. *江苏食用菌* 1992, 1: 1~2.
- [6] 潘迎捷, 陈明杰, 汪昭月, 等. "Proceedings of the international Symposium on mushroom Biotechnology (1989 Nanjing)". 1989, 285~294.
- [7] 余多慰, 陆佩洪, 何强泰, 等. *江苏食用菌*, 1994, 1: 31.
- [8] 朱铭富, 张志才, 郭守玉. *食用菌*, 1992, 4: 6~7.
- [9] 周伏忠, 俞大绥, 李秀玉. *国际食用菌生物技术学术讨论会论文集(中文版)*, 南京:《江苏食用菌》编辑部出版, 1989, 108~110.
- [10] 盛祖嘉. *微生物遗传学*, 北京: 科学出版社, 1983, 206~214.
- [11] 郝水. *细胞生物学教程*, 北京: 高等教育出版社, 1983, 83~112.
- [12] 佐佐木尧. *遗传*, 1986, 40(6): 15~20.
- [13] 尤复翰, 陆佩洪. *细胞的发育*, 南京: 江苏科学技术出版社, 1983, 13~46.

THE OBSERVATION ON PROTOPLAST GIANTING AND ITS REGENERATION OF SEVERAL EDIBLE FUNGI

Zhou Fuzhong Jia Shenmao

(The Biology Institute of Henan Province, Zhengzhou 450003)

Li Xiuyu

(Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract In this paper, the process of protoplast gianting of several edible fungi were observed. It

was found that, nutrient solution with high osmotic pressure containing cell wall lytic enzymes was a better reacting solution for protoplast gianting. The regeneration frequencies of giant protoplast of different times have a change of "high→lower→high", the gianted protoplasts have a higher regeneration frequency than normal protoplasts. Final, several factors were tested for its influence on the regeneration of giant protoplasts.

Key words *Lentinus edodes*, *Pleurotus florida*, Giant protoplast, Regeneration of giant protoplasts