

榆耳菌丝原生质体制备及再生的研究

刘宏宇, 郭鹏程, 姚方杰*

(吉林农业大学, 长春 130118)

摘要:对珍稀食药菌榆耳的原生质体制备与再生的条件进行优化,明确了原生质体制备的最佳条件:采用培养时间为7 d的菌丝,使用0.6 mol/L的甘露醇溶液作为稳渗剂配制的浓度为2%的溶壁酶溶液,在30℃的恒温摇床中70 r/min酶解3 h,原生质体产率最高。用RM4配方,28℃条件下的再生率最高,最高再生率可达1.83%。

关键词:榆耳;原生质体;制备与再生

中图分类号:S567.3

文献标识码:A

文章编号:1003-8701(2018)02-0060-05

Optimization of Preparation and Regeneration Conditions of *Gloeostereum incarnatum* Mycelium Protoplast

LIU Hongyu, GUO Pengcheng, YAO Fangjie*

(Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The article working on optimized the protoplast preparation and regeneration conditions of rare edible fungi *Gloeostereum incarnatum*. The conditions are defined, use mycelium cultured 7 d, and 0.6 mol/L mannitol solution was used as Osmotic stabilizer to make lywallzyme solution of 2%. At 30℃, 70 r/min Enzymatic hydrolysis of 3 hours, the largest protoplasts yield can be obtained. The regeneration rate of RM4 medium at 28℃ was the highest, regeneration rate could reach 1.83%.

Key words: *Gloeostereum incarnatum*; Protoplast; Preparation and regeneration

榆耳(*Gloeostereum incarnatum*)又名肉蘑、榆蘑和沙耳。其分类地位为担子菌门,蘑菇纲,伞菌目,挂钟菌科,榆耳属,主要分布在北温带地区^[1]。肉质肥厚,味道鲜美,极具营养保健价值^[2-3],是东北地区珍稀的药食兼用真菌,同时也具有较高的经济价值^[4]。

原生质体技术自1972年被应用于制备了裂褶菌原生质体后^[5],被广泛应用于种质资源保藏、突变体的筛选、工程菌株改造、细胞膜结构与遗传转化等多个研究领域,在食用菌的研究中,具有广泛的应用,在食用菌的遗传转化研究中,原生质体是良好的转化材料。针对孢子难以萌发的食用菌品种,可通过原生质体单核化获得育种材料^[6-7]。

随着近年来相关酶制剂的发展与技术的进

步,原生质体制备所使用的酶制剂也取得了长足的发展。但因不同食用菌的菌丝特性不同,原生质体制备与再生条件也不尽相同,需有针对性地对条件进行探索优化,才能获得高质高量的原生质体。而原生质体的质量对后续实验的影响较大。本文首次对榆耳菌丝制备原生质体与再生的主要条件进行筛选与改进,为遗传转化与育种等研究工作奠定基础^[8-10]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种

榆耳菌株Y6由吉林农业大学姚方杰教研室提供。

1.1.2 培养基

预培养液体培养基:马铃薯200 g(煮汁过滤),葡萄糖20 g,蛋白胨2 g,酵母浸粉2 g,磷酸二氢钾3 g,七水合硫酸镁2 g,定容1 L。

菌丝扩增培养基:多蛋白胨10 g,酸水解酪蛋白2 g,麦芽提取物10 g,酵母提取物4 g,定容1 L。

原生质体再生培养基:

收稿日期:2017-11-17

基金项目:吉林省高等学校经济菌物高端科技创新平台项目(吉高平合字[2014]B-1)

作者简介:刘宏宇(1990-),男,在读硕士,研究方向为菌类作物栽培与育种。

通讯作者:姚方杰,女,博士,教授, E-mail: yaofj@aliyun.com

RM1: 马铃薯 200 g(煮汁过滤), 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 2 g, 酵母浸粉 2 g, 磷酸二氢钾 3 g, 七水合硫酸镁 2 g, 琼脂粉 15 g, 维生素 B₁ 1 mg, 定容 1 L。

RM2: 马铃薯 200 g(煮汁过滤), 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 2 g, 酵母浸粉 2 g, 磷酸二氢钾 3 g, 七水合硫酸镁 2 g, 山梨醇 109.3 g, 维生素 B₁ 1 mg, 琼脂粉 15 g, 定容 1 L。

RM3: 马铃薯 200 g(煮汁过滤), 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 2 g, 酵母浸粉 2 g, 磷酸二氢钾 3 g, 七水合硫酸镁 2 g, 甘露醇 109.3 g, 维生素 B₁ 1 mg, 琼脂粉 15 g, 定容 1 L。

RM4: 蔗糖 10 g, 麦芽提取物 10 g, 酵母提取物 4 g, 甘露醇 109.3 g, 琼脂粉 15 g, 定容 1 L^[11]。

1.1.3 溶壁酶

溶壁酶 lywallzyme 采购自广东省微生物菌种保藏中心。

1.1.4 高渗溶液

分别采用硫酸镁、山梨醇、甘露醇、蔗糖、氯化钠、氯化钾作为稳渗剂用以配制高渗溶液, 使用 0.05 mol/L 的 pH 为 5.8 的磷酸缓冲液进行配制。配制完成后, 115℃ 高压灭菌 15 min, 冷却至室温后备用。

1.2 方法

1.2.1 菌丝培养

取 5 mL 预培养液体培养基加入生长 7~9 d 的平板培养基中, 用接种钩刮取平板培养的菌丝, 用去头的枪头吸至 50 mL 的液体培养基中, 置于摇床中 25℃, 160 r/min 培养 5~7 d。

将预培养的菌液作为菌种, 吸取 5 mL 加入到 45 mL 的菌丝扩增培养基中, 置于摇床中 25℃, 培养 4~9 d。

1.2.2 原生质体制备的基本方法

在超净台中, 使用 6 层无菌纱布过滤收集菌丝, 使用相应高渗溶液冲洗后, 用无菌滤纸压滤吸干水分。酶液用相应的稳渗剂按对应浓度稀释后, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤灭菌, 按照菌丝体: 酶液=1:3(m:V) 的比例加入。用无菌研磨棒轻轻研磨 2~3 次, 使菌丝充分混匀。采用不同的温度与酶解时间, 放入摇床中 70 r/min 进行原生质体制备。酶解完成后, 在超净台中, 使用填装有厚度为 0.5 mm 脱脂棉的无菌注射器进行菌丝过滤, 并收集滤液。将滤液 3 000 r/min 离心 5 min, 小心弃去上清, 加入相应高渗溶液 1 mL, 轻轻上下颠倒进行冲洗后, 再次 3 000 r/min 离心 5 min, 重复两次后, 使用高渗溶液 0.5 mL 重悬原生质体, 用

血球计数板计算原生质体得率^[12]。

1.2.3 原生质体最佳条件的筛选

通过对稳渗剂种类、浓度及菌丝菌龄采用单因素试验进行筛选。酶解温度、酶解时间、酶浓度采用正交试验进行筛选。在酶解反应中, 酶解温度、酶解时间与酶浓度是至关重要且紧密联系的三个因素, 决定了酶促反应的效力, 故采用正交试验分析筛选其最适条件。采用 SPSS 设计 3 因素 5 水平的正交试验, 每个处理重复 3 次。以原生质体的得率确定最优的反应条件^[13-14]。正交试验各因素及水平见表 1。

表 1 正交试验设计表

水平	试验因素		
	A. 酶解温度(℃)	B. 酶解时间(h)	C. 酶浓度(W/V)
1	26	1.5	1.0
2	28	2.0	1.5
3	30	2.5	2.0
4	32	3.0	2.5
5	34	3.5	3.0

1.2.4 原生质体再生培养基的选择

将制得的原生质体悬液使用相应的稳渗剂将浓度调整为 1×10^5 个/mL 后, 用移液枪吸取 100 μL 原生质体悬液, 均匀轻缓地涂布于各再生培养基上, 置于 25℃ 的培养箱中培养 15 d, 统计再生的菌落数并计算再生率。

$$\text{再生率}(\%) = \frac{\text{再生菌落数}}{\text{原生质体总数}} \times 100\%$$

1.2.5 酶解时间对再生率的影响

将不同酶解时间制备的原生质体浓度调整为 1×10^5 个/mL 后, 用移液枪吸取 100 μL 原生质体悬液, 均匀轻缓地涂布于筛选得到的最优的再生培养基上, 25℃ 培养 15 d, 统计再生菌落数并计算再生率。

1.2.6 温度对再生率的影响

将原生质体浓度调整为 1×10^5 个/mL 后, 用移液枪吸取 100 μL 原生质体悬液, 均匀轻缓地涂布于筛选得到的最优的再生培养基上, 分别于 22℃、24℃、26℃、28℃、30℃ 培养 15 d, 统计再生菌落数并计算再生率。

2 结果与分析

2.1 稳渗剂及浓度的筛选

分别选取硫酸镁、甘露醇、山梨醇、蔗糖、氯化钠、氯化钾, 并使用 0.5、0.6、0.7 mol/L 三个浓度梯

度制作稳渗剂,用来制作酶浓度为2%的酶液和调节原生质体悬液浓度。由图1可知,0.6 mol/L的甘露醇作为稳渗剂时,原生质体制备得率最高。在溶壁酶的作用下失去细胞壁保护的原生质

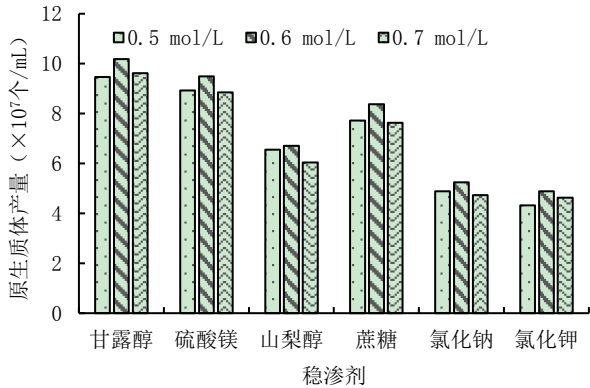


图1 稳渗剂种类及浓度对原生质体制备的影响

体极易因为细胞内外渗透压不平衡导致细胞吸水涨破或因为较高浓度失水皱缩,所以合适浓度的稳渗剂可为原生质体提供一个稳定的环境,不会因浓度过低或过高影响产率。

2.2 酶浓度、酶解时间、酶解温度的筛选

收集菌龄为7 d的菌丝,加入使用0.6 mol/L甘露醇溶液配制的酶液,根据正交试验设计表的试验方法进行试验并进行分析,结果见表2。

由表2可知,通过SPSS分析,三个影响因素的sig值均小于0.01,表明三个因素对原生质体都有极显著的影响。通过对具有显著影响的三个因素进行两两比较检验,分析其最佳制备条件,由图2可知,最佳的制备条件为A3B4C3,即采用浓度为2%的溶壁酶,在30℃下反应3 h,原生质体得率最高,为最佳制备条件。

表2 酶解温度、酶解时间、酶浓度正交试验结果

源	III 型平方和	df	均方	F	Sig.	偏 Eta 方
校正模型	2.522E16	12	2.101E15	34.896	0.000	0.871
截距	3.919E17	1	3.919E17	6 508.397	0.000	0.991
A 酶解温度	1.305E16	4	3.262E15	54.160	0.000	0.777
B 酶解时间	4.427E15	4	1.107E15	18.378	0.000	0.542
C 酶浓度	7.744E15	4	1.936E15	32.149	0.000	0.675
误差	3.734E15	62	6.022E13			
总计	4.209E17	75				
校正的总计	2.895E16	74				

注: R²=0.871(调整 R²=0.846)

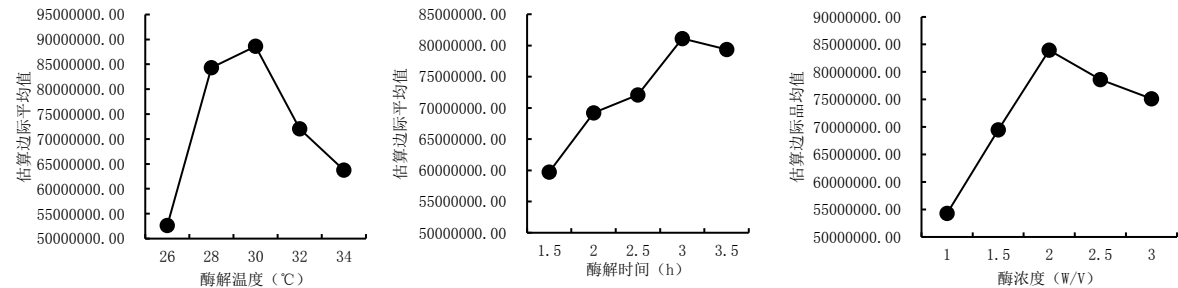


图2 酶浓度、酶解时间、酶解温度的正交筛选

2.3 菌龄的筛选

分别收集培养5 d、6 d、7 d、8 d、9 d的等重量的菌丝,使用0.6 mol/L的甘露醇高渗溶液配制酶浓度为2%的酶液进行酶解,温度为30℃,酶解时间3 h,过滤收集菌丝。菌丝的菌龄决定了其细胞壁的厚度、菌丝活性以及耐受性,从而影响原生质体的制备和再生。培养时间短,菌丝积累量少,菌丝的细胞壁较薄,容易酶解过度导致产量

和再生率降低。菌丝培养时间过长,菌丝体老化,活力降低,细胞壁过厚,不易被酶解,也会影响原生质体的产量和再生率。由图3可知,采用培养了7 d的菌丝制备的原生质体产量最高。

2.4 再生培养基的筛选

收集菌龄为7 d的菌丝,加入使用0.6 mol/L的甘露醇溶液配制的浓度为2%的酶液,放入摇床70 r/min转速下30℃酶解3 h。过滤收集原生质

体,得到如图4所示的原生质体。涂布于再生培养基上,25℃培养15 d。统计再生菌落数并计算再生率。如图5所示,RM1、RM2、RM3、RM4的再生率分别为1.06%、1.53%、1.79%、1.83%。

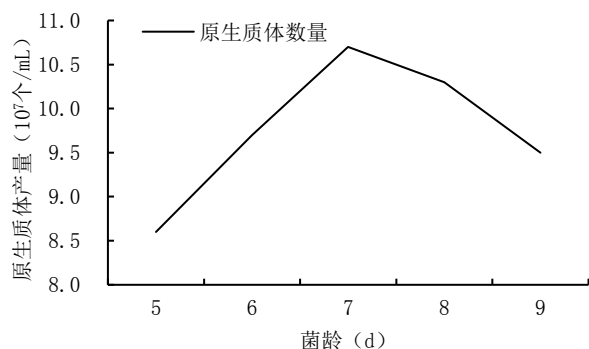


图3 不同菌龄对原生质体制备的影响

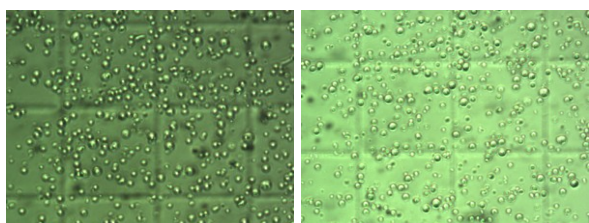


图4 酶解时间3 h的原生质体

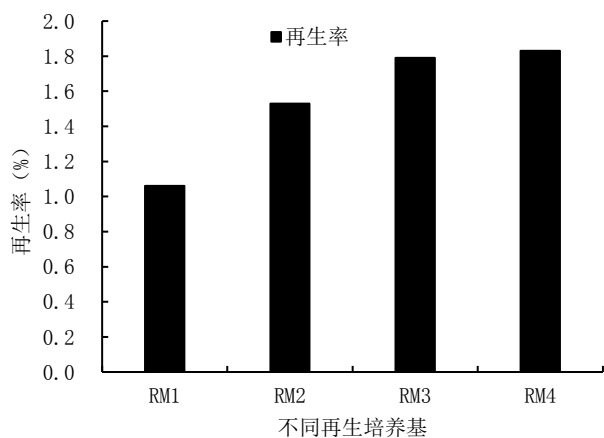


图5 再生培养基对原生质体再生率的影响

2.5 酶解时间对再生率的影响

收集菌龄为7 d的菌丝,加入使用0.6 mol/L的甘露醇溶液配制的浓度为2%的酶液,放入摇床70 r/min转速下30℃,分别酶解1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h。过滤收集原生质体,用稳渗剂调节原生质体浓度并涂布于RM4再生培养基上,25℃培养15 d。统计再生菌落数并计算再生率。由图6可知,1~2 h时再生菌落数无较大变化,2~3 h时,再生菌落数呈下降趋势,说明过长时间的酶解导致原生质体过度酶解或受到细胞毒害作用导致其再生困难,影响其再生率,因酶解1.5 h产率较低,可能

无法满足实验需求,综合考虑,2 h为最佳酶解时间,此时再生率为1.83%。

2.6 温度对再生率的影响

将原生质体浓度调整为 1×10^5 个/mL后,用移液枪吸取100 μ L原生质体悬液,均匀轻缓地涂布于RM4培养基上,分别于20℃、24℃、28℃、32℃培养15 d,统计再生菌落数并计算再生率。结果如图7所示,在28℃时,原生质体再生率最高,为1.83%。

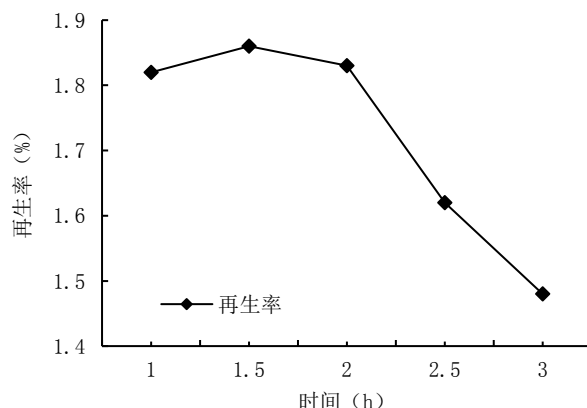


图6 酶解时间对再生率的影响

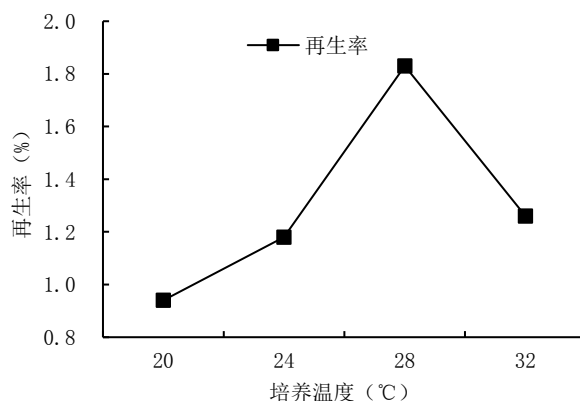


图7 培养温度对再生率的影响

3 讨论与结论

通过试验对榆耳原生质体制备与再生的条件进行探究与改进,实验结果表明:

3.1 原生质体制备:采用培养时间为7 d的菌丝,使用0.6 mol/L的甘露醇溶液作为稳渗剂配制的浓度为2%的溶壁酶酶液,在30℃的恒温摇床中70 r/min酶解3 h,原生质体的产率最高,为 1.11×10^8 个/mL。当酶解时间为2 h时可获得再生活力最高的原生质体,而酶解3 h时原生质体的产率最高,应根据后续实验的需要选择适合的酶解时间。

3.2 原生质体再生:通过对培养温度及再生培养

基的筛选可知,在28℃下培养, RM4配方的再生率最高,再生率可达1.83%。

原生质体制备的条件中,稳渗剂的选择和浓度以及酶浓度对制备的影响较大。为了使菌丝体与酶液混合均匀,应采用移液器吹打或漩涡混匀,在大量菌丝难以充分离散混匀时,可采用研磨杵轻微研磨,同时使用摇床70 r/min代替传统的水浴加热定时颠倒混匀,可在充分混匀酶解液的同时避免了混匀动作剧烈导致产率下降的问题。

在制备过程中,过长的酶解时间会导致再生率降低,因溶壁酶中不可避免地会含有核酸酶与蛋白质酶,长时间酶解或酶液浓度过高破坏原生质体的细胞膜糖蛋白及核酸,使其活性下降、细胞结构难以恢复,导致再生率下降^[15]。而原生质体的制备多用于遗传转化及融合育种等对原生质体活力和再生率要求较高的研究中,若再生率低,无论制备产量再高,都将对后续的实验造成不良影响。试验中还发现,山梨醇和甘露醇两种稳渗剂对产量的影响相差较大,究其原因可能是二者为同分异构体,其构象不同导致其稳定性不同,高压灭菌后山梨醇浓度降低所致,同时甘露醇为多羟基化合物,其可与酶形成氢键从而稳定其构象,从而提升其酶解效率,增加原生质体的产量。

参考文献:

[1] 宋宏,姚方杰,唐峻,等.榆耳研究概况[J].中国食用菌,2008,27(1):3-4,13.

- [2] 于娅,姚方杰,孙梅丽,等.榆耳春秋季节栽培管理技术[J].北方园艺,2013(10):145-146.
- [3] 于娅,姚方杰,孙梅丽,等.榆耳新品种‘旗肉1号’[J].园艺学报,2013,40(5):1015-1016.
- [4] 于娅.榆耳种质资源评价及优良品种选育的研究[D].长春:吉林农业大学,2013.
- [5] Wessels J G H. Release of Protoplasts From Schizophyllum Commune By a Lytic Enzyme Preparation From Trichodevma Vivide[J]. Journal of General Microbiology, 1972(1): 13-22.
- [6] 方明,姚方杰,陈影,等.几种主要食用菌的遗传转化研究进展[J].菌物研究,2012(3):195-200.
- [7] 刘方.灵芝原生质体单核化杂交育种[D].福州:福建农林大学,2009.
- [8] 王昱,王义,王康宇,等.灵芝原生质体的制备与再生研究[J].北方园艺,2013(16):184-188.
- [9] 于清伟.秀珍菇原生质体制备研究[J].食用菌,2016(2):22-23.
- [10] 王谦,马旭光,刘敏,等.原生质体紫外诱变选育猴头菌株[J].北方园艺,2014(16):145-147.
- [11] Faraco V. Enhanced Green Fluorescent Protein Expression in Pleurotus Ostreatus for in Vivo Analysis of Fungal Laccase Promoters[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2012, 168(4): 761-769.
- [12] 孙露,姚方杰,方明.毛木耳原生质体制备与再生条件的研究[J].中国食用菌,2012,31(3):35-37.
- [13] 许修宏,孟琦,刘华晶,等.黑木耳菌丝原生质体的制备、再生及单核鉴定研究[J].东北农业大学学报,2011(8):96-100.
- [14] 张琪.猴头菌原生质体制备及基因组序列的初步分析[D].济南:山东中医药大学,2015.
- [15] 邱景芸,廖汉泉,吴月嫦.一种溶高等担子菌细胞壁酶的制备[J].遗传,1982(4):15-16,26.

(责任编辑:王昱)