

尖顶羊肚菌原生质体的分离及再生

张鉴铭 郑王萍 陈梅英 纪大千

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明)

摘要 培养在液体培养基中的尖顶肚菌 (*Morchella conica* Pers) 菌丝体可以分离出大量的原生质体。在组合的 2 号酶液中, 在 30℃ 下经 4.5 小时处理的产量最高 (为 6.2×10^8 个原生质体/100mg·ml)。此法分离得的原生质体再生力很强, 液体培养 18 小时即可再生成菌丝。再生的细胞进行植板培养后形成了菌丝体, 并获得了从原生质体再生的菌株。

关键词 尖顶羊肚菌; 原生质体; 菌丝体的再生

食用菌原生质体培养及融合的研究可能为食用菌的育种提供一条新途径, 国内外越来越多的科学家正从事这项研究 [1, 2, 3]。尖顶羊肚菌是珍贵的食用菌之一 [4], 它的原生质体的研究还未见报道。

材 料 和 方 法

1. 实验材料

尖顶羊肚菌 (*Morchella conica* Pers) 菌种是纪大千等同志从云南野生种的子实体分离并保存的。培养在液体培养基中或培养在固体培养基的玻璃纸上 2—4 天的菌丝体用作分离原生质体的实验材料。

2. 培养基的配制

培养菌丝体的培养基: M_1 依据 MS 培养基 [5] 的组分再加椰乳 20ml/l 配制。 M_2 依据 Wakabayashi, S. 等的配方 [6] 配制。 M_3 马铃薯综合培养基。

根据以上配方配制成液体培养基。固体培养基再加入 0.5% 琼脂, 在培养基的表面再加上一层玻璃纸, 用以培养分离原生质体的菌丝体。

培养原生质体的液体培养基: M_4 蛋白胨 5g/l、酵母膏 5g/l、甘露醇 0.35M、山梨醇 0.35M、葡萄糖 10g/l、磷酸二氢钾 60mg/l、硫酸镁 60mg/l。

原生质体再生细胞的植板培养基与培养菌丝体的固体培养基相同。

3. 酶溶液的配制

先配成含有 0.5M 的硫酸镁及 0.06% 吗啡啉乙烷磺酸 (2-Morpholino-ethanesulfonic acid) 的溶液再加入下列 (表 1) 5 种不同组合的酶。pH 调为 5.4, 用滤纸滤去沉淀, 再用孔径为 0.45 μ m 的滤膜过滤灭菌后, 贮存于 0℃ 待用。

除了酶液组合的比较试验外,其余实验都是用2号酶液进行的。

4. 原生质体的分离和培养

液体培养的菌丝体用0.6M的硫酸镁溶液洗涤后,用滤纸吸去表面水分,称量后放入酶液中,每ml酶液约100mg菌丝。在各种不同温度下静置不同时间,在此期间轻轻摇动1—2次。比较各种酶液分离效率的实验取在不同酶液中酶解的材料用血球计数板在显微镜下计数,再计算成原生质体的产量(原生质体数/100mg·ml)。分离菌丝体后的酶液用孔径为50—100μm尼龙丝网过滤除去未被酶解的菌丝,滤液中仍然混有较小的未被酶解的菌丝碎片。用0.6M的硫酸镁溶液按已报道^[7]的通底离心管漂洗纯化原生质体的方法纯化原生质体。得到较纯净的原生质体接种于原生质体培养液M₁中,稀释到一定密度,用血球计数板计数。静置培养在25°C下,18小时后多数原生质体已再生细胞壁形成再生细胞,少数已长出菌丝。接着把它植板在固体培养基上,再培养24小时后形成肉眼可见的菌丝体。可以分离出单个菌落继续培养而形成从原生质体再生的菌株。

表1 酶液的不同组分(%)
Table 1 Different composition of enzyme solution (%)

酶类 Enzymes	酶液号 Enzyme solution No.				
	1	2	3	4	5
纤维素酶 Cellulase (Onozuka R-10)	2	2	2		0.5
高折酶 Macerzyme R-10	1				
崩液酶 Dis-lase	1	1	1		
半纤维素酶 Hemicellulase	0.5	0.5	0.5		
蜗牛酶 Helicase		0.5			0.5
溶壁酶 Lywallzyme				1.5	1

结果和讨论

1. 酶的组分与原生质体的产量

分离真菌原生质体的酶有多种,对不同的食用菌需不同的酶的组合^[2]。为了选出较适当的酶液,用了5种不同组合的酶液(表1)作了分离原生质体的比较试验。结果(表2)表明:2号液及4号酶液对尖顶羊肚菌的原生质体分离有较好的效果。2号酶液分离的原生质体的产量可高达 6.2×10^6 个原生质体/100mg·ml。2号酶液是由多种酶组成的,也说明尖顶羊肚菌菌丝原生质体的分离需要各种酶的配合。

酶液配制后存于0°C冰箱,随着贮存时间的延长酶液的活性降低。贮存两周后约降低为贮存5天的1/2(表2、2号酶液、4号酶液、4.5小时分离的产量)。20天以后酶液分离原生质体的活性几乎全部丧失。

2. 酶液处理的时间、温度与原生质体产量的关系

用已在0°C下贮存16天的2号酶液对培养在M₁培养液中2天的菌丝体,在21°C、

25°C及30°C下, 处理1—6.5小时的分离原生质体比较实验的结果如图1所示。实验结果表明: 酶分离原生质体的产量随着温度的升高而增加, 以30°C的产量最高; 随着时间的延长而增加, 在3.5小时达到最高点, 以后不再增加。在30°C时较合适的分离时间是3—5小时。本文报道的原生质体培养实验就是在这样的条件下分离的原生质体。

表2 各种酶液分离的原生质体的产量

Table 2 Protoplast yields isolated in different enzyme solution

时间(小时) Time (h)	原生质体产量 $\times 10^5 / 100\text{mg} \cdot \text{ml}$ Protoplast yields					备注
	酶液号 Enzyme solution No.					
	1	2	3	4	5	
4.5	5.8	26.7	9.6	23.7	7.0	液体培养的菌丝体, 酶液在0°C下存14天
1.5		11.0		27.1		固体培养基上的菌丝体
4.5		47.0		55.0		酶液在0°C下存5天
1.5		27.1		25.4		液体培养的菌丝体
4.5		62.0		44.0		酶液在0°C下存5天

注: 所有原生质体的分离在30°C下进行。 Not: All protoplast isolations are in 30°C.

3. 菌丝培养条件对原生质体分离的影响

尖顶羊肚菌菌丝在M₁、M₂及M₃的液体培养或固体培养基上生长速度不同, 在四天后都长满150ml三角瓶底(液体培养)或8cm的培养皿(固体培养)。用生长2—3天液体培养的菌丝体分离原生质体时, 对产量没有明显的影响, 用已长满瓶底的菌丝体分离原生质体, 产量大大降低, 小于 2×10^5 个原生质体/100mg·ml, 甚至得不到原生质体。

菌丝在酶液中被分离的原生质体的数量除了与酶液的组合、温度和时间有密切的关系外, 菌丝的培养条件对原生质体的质量(即稳定性)有较大的影响。在酶液中计数时, 液体培养和固体培养的菌丝体分离的原生质体数量

相差不大, 而纯化后的得率却大不相同, 液体培养的菌丝体分离得的原生质体较稳定, 在纯化过程中破碎较少、损失较少, 得率为酶液中的36—38%。而在固体加玻璃纸上培养的菌丝体分离得的原生质体, 经纯化后得率很低, 得率约为酶液中的7%。

4. 原生质体培养成再生的菌丝体

酶分离得到的经纯化后的原生质体在显微镜下是圆球体, 多数直径在10 μm 以下, 在30 μm 以上的很少, 可以观察到较大的圆球体是由多个原生质体融合而成的融合体。原生质体接种在M₂培养液中, 培养在25°C下18小时后可观察到部分原生质体发芽长出菌丝, 有的长出一条菌丝, 有的从不同方向长出2—3条菌丝, 也有长出后即分枝的。菌丝的长度可为原生质体直径的2—5倍。这时未长菌丝的大多数原生质体已再生细胞

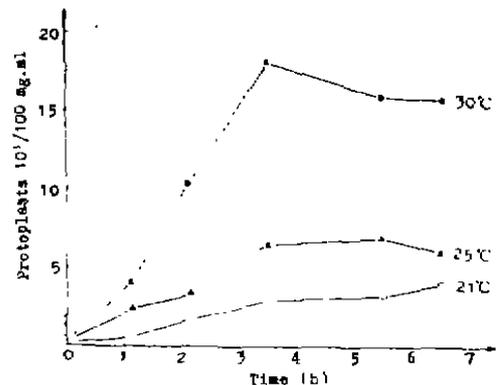


图1 原生质体的产量与温度和时间关系
Fig. 1 Relation of the protoplast yield with the temperature and time

壁成为再生细胞。21小时后约半数以上的原生质体都长出了不同长度的菌丝。接种原生质体的密度在 0.5×10^5 — 5×10^5 个/ml之间都再生了菌丝。在培养液中由于原生质体的团聚较多, 从一团原生质体向各方向长出很多菌丝, 就很难分辨这团原生质体中那一个再生菌丝那一个没有再生, 所以再生的频率是很难计算的。如何减少团聚是值得进一步研究的。

培养18小时已观察到原生质体长出不同长度的菌丝, 表明在这之前原生质体已再生了细胞壁, 可以植板到琼脂培养基上; 如培养24小时, 部分较早再生的菌丝已形成互相缠绕的菌丝体, 植板已较晚。

植板在琼脂培养基上的再生细胞再培养24小时后形成肉眼可见的菌丝群落, 这时可以分别挑取菌丝体转入试管内培养后获得再生的菌株, 保存留作进一步的研究。植板在前述三种培养基上的原生质体都能再生成菌丝体, 生长速度差别不大, 都能在2—3天内长满6 cm的培养皿。

尖顶羊肚菌原生质体分离及培养的试验结果表明: 它的液体培养的菌丝体在几种酶混合的2号酶液中在30°C下是容易分离出大量的原生质体, 原生质体再生力很强, 生长很快。这一结果为进一步开展原生质体融合、筛选高产优质新菌株的研究奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 柳国江, 化学与生物 1986; 285—287
- 2 大政正武, 农业与园艺 1985; 60:200—204
- 3 杨新美, 中国食用菌 1987; (2): 5 及(3): 6
- 4 张光亚, 云南食用菌, 昆明, 云南人民出版社, 1984: 57
- 5 Murashige T, Skoog F. *Physiol Plant* 1962; 15:473—497
- 6 Wakabayashi S et al. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1985; 21:328—330
- 7 张盛德, 匡安秀, 云南植物研究 1980; 2:315—318

PROTOPLAST ISOLATION AND ITS REGENERATION OF MORCHELLA CONICA

Zhang Jianming, Zheng Yuping, Chen Meiyang, Ji Dagan

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming)

Abstract Protoplasts of *Morchella conica* Pers were isolated from the mycelia cultured in liquid medium. The highest isolated quantity was 6.2×10^8 protoplasts/100mg·ml in mixed enzyme solution No. 2 and at 30°C for 4.5 h in cubation. Isolated protoplasts regenerated to hyphae readily. After 18 hours of incubation hyphae grew out from the cells regenerated from the protoplasts. Following plating on solid medium regenerated isolates were obtained.

Key words *Morchella conica*; Protoplasts; Mycelium regeneration