

香菇和侧耳属间原生质体的电融合研究*

张鉴铭 郑玉萍 陈梅英
(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

S64601

摘要 从培养在液体培养基中的香菇、美味侧耳和平菇的单核菌丝用酶法分离了原生质体。施加 0.5MHz、500PV/cm 的正弦波和 50μs、6000PV/cm 方形脉冲的电场诱导下使其电融合。电融合后的融合子和原生质体在固体培养基上植板培养成菌落。在显微镜下检查融合子菌株菌丝的锁状联合选出从融合子长成的菌株。香菇和美味侧耳的融合菌株产生频率为 61.53%，香菇和平菇的融合菌株产生频率为 32.58%，根据融合菌株与亲本的拮抗作用和他们的过氧化物同工酶和酯酶同工酶的电泳图谱与其亲本酶谱的不同，证实这些融合菌株是从融合的异核体生长成的。同时讨论了电融合方法和结果。

关键词 香菇属; 侧耳属; 原生质体; 电融合

STUDY ON INTERGENETIC ELECTROFUSION OF PROTOPLASTS BETWEEN LENTINUS AND PLEUROTUS

ZHANG Jian-Ming, ZHENG Yu-Ping, CHEN Mei-Ying
(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract The protoplasts isolated enzymically from monokaryotic mycelia of *Lentinus edodes*, *Pleurotus sapidus* and *Pleurotus ostreatus* cultured in liquid medium were electrofused by means of supplying electric field of sine wave 0.5MHz, 500PV/cm and square pulse 50μs, 6000PV/cm. The colonies grew up from the fusants or protoplasts plated on solid medium after electrofusion. The strains from fusants were selected by discovering clamp connection of fusant mycelia under a microscope. Frequency of regenerating strain from fusant was 61.53% between *Lentinus edodes* and *Pleurotus sapidus*, 32.58% between *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*. It was demonstrated that fusant strains grew from the heterkaryon according to antagonistic action of fusant strains and parents and difference of their electrophoretogram of esterase and peroxidase isoenzyme from those of their parents. While the electrofusion method and results were discussed.

Key words *Lentinus*; *Pleurotus*; Protoplasts; Electrofusion

1991年5月收稿，同年11月定稿。
* 国家自然科学基金及云南省应用基础基金资助项目。

细胞融合是近代新发展起来的一项细胞工程技术,它可能作为一项新的育种技术而受到重视,国内外越来越多的科学工作者都正在进行着这项研究。食用菌原生质体融合研究开展较晚,但进展较快⁽¹⁾。

自70年代用PEG诱导植物原生质体融合^(2,3)成功后,植物原生质体融合技术得到较快的发展。PEG融合法也已被用于香菇^(4,5)、平菇⁽⁶⁾、木耳⁽⁷⁾等多种食用菌原生质体的融合,取得了一定成绩。PEG融合法虽然是较成功的技术,但也存在PEG对原生质体毒性大、诱导细胞融合的频率低,融合操作烦琐等问题。

最近发展起来的细胞电融合是一种新的细胞融合技术⁽⁸⁾,Zimmermann等人在细胞电融合方面进行了很多研究工作,作者为了研究电融合应用于食用菌原生质体的可行性,为实际应用提供实验依据,参照Zimmermann等⁽⁹⁾的电融合基本原理进行了香菇和侧耳属间原生质体电融合的研究。

材料和方法

1. 菌种

(1) 579是香菇单核菌株。本实验室从香菇(*Lentinus edodes*(Berk.) Singer) 7405菌株的原生质体克隆中选出了结菇较多的57号菌株,再从57号的担孢子原生质体经紫外线诱变选出的生长较快的一个单核菌株。

(2) CD是美味侧耳(*Pleurotus sapidus*(Schulz.) Sacc.)的单核菌株,从昆明采集野生子实体组织分离得纯菌种(Cg)经栽培产生子实体收集担孢子培养分离的单核菌株。

(3) PD是平菇(*Pleurotus ostreatus*(Jacq.: Fr.) Quél)的单核菌株。从上海2号平菇的担孢子培养分离而获得。

以上菌株的菌丝都经过多次显微镜检查,确系无锁状联合的单核菌株。

2. 培养基及各种溶液的配制

马铃薯综合培养基M₃按已报道⁽¹⁰⁾的配方配制,用以培养菌丝体,菌丝洗涤液为0.6mol/l MgSO₄·7H₂O及3mmol/l 吗啡啉乙烷磺酸。分离原生质体的酶液按已报道⁽¹⁰⁾的2号酶液的组份配制,经过滤灭菌存于0℃下备用。电融合时用的电激液为0.3mol/l 甘露醇、0.3mol/l 山梨醇及0.1mmol/l CaCl₂·2H₂O组成。原生质体培养基为M₃的成分加入0.3mol/l 甘露醇及0.3mol/l 山梨醇,固体培养基再加入0.5%的琼脂粉。

3. 原生质体的分离

将在M₃培养液中培养4—7天的幼嫩菌丝剪下用菌丝洗涤液洗净,用灭菌的滤纸吸干称重后,浸泡在酶液中,静置30℃下酶解4小时,中间轻轻摇动1—2次。已酶解的含有原生质体的酶液通过G₂砂心漏斗过滤,除去未被酶解的菌丝。滤液在2000转/分的速度下离心5分钟收集原生质体,用原生质体洗涤液再悬浮,再离心洗去酶液,加入电激液,调整原生质体的密度至10⁶/ml个原生质体以备融合用。

4. 电融合及融合菌株的筛选

所使用的DR-II型多功能细胞电融合仪为清华大学生物科学与工程系等单位研制,平行电极的电融合小室为本实验室自制。

将已制备好的原生质体悬浮液各吸取0.5ml在试管中混合均匀后,再用滴管吸取0.2ml滴入电融

合小室内的平行电极间, 接通电极于细胞融合仪的输出接头上。先施加适当的正弦波电场使原生质体极化而产生电介质电泳移动, 进而形成串珠, 继而施加方形波脉冲的强电场, 使原生质体的膜发生可逆性的击穿而发生融合。施加电场后原生质体的移动、珠串、融合的变化情况都可以在显微镜下观察, 从而选定较合适的各种电参数。

电融合操作完成后, 用滴管将原生质体悬浮液从电融合小室吸取转移到固体培养基上植板培养, 培养 10 天后, 把已长成肉眼可见的单个菌落分离培养成菌株, 留待筛选融合的菌株。

融合菌株的选出: 电融合处理后的原生质体悬浮液中有已融合的融合子及未融合的原生质体, 随后都可能被培养成菌株。如来源于未融合的单核原生质体的菌株则菌丝没有锁状联合, 只有来源于融合子的双核菌丝会发生锁状联合。在显微镜下检查各株的菌丝, 选取有锁状联合的菌株算是由融合子长成的菌株, 留待作进一步的测试。

融合菌株产生频率 $F = N_f / (N_f + N_p) \times 100\%$, N_f 为菌丝具有锁状联合的菌株数, N_p 为菌丝没有锁状联合的菌株数。

5. 融合菌株和亲本的拮抗试验

把融合菌株接种于培养皿内马铃薯综合培养基的中央, 亲本菌株接种在它的周围 15 天后观察它们之间拮抗反应的情况。

6. 同工酶谱的测定

将已选出的融合菌株和亲本菌株在同样条件下液体培养 14 天, 取出菌丝用 pH6.8, 0.2mol/l 的 Tris-HCl 缓冲液浸泡, 冰冻 24 小时, 研磨提取水溶性酶类。经聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳作脂酶及过氧化物同工酶谱的比较。浓缩胶的浓度为 3%, 分离胶的浓度为 7.5%, 电泳在冰箱中 4℃ 以下进行。脂酶同工酶用醋酸萘酚、RR-牢固蓝染色。过氧化物同工酶用联苯胺、维生素 C 及过氧化氢染色。

结果和讨论

1. 适合食用菌原生质体电融合的电参数

根据 Zimmermann 的电融合原理, 首先加以不均匀的交变电场使原生质体极化, 发生电介质电泳移动而形成串珠, 再加方波脉冲电激使细胞膜发生可逆性的击穿或破裂而发生融合。为了确定各种电参数, 在显微镜下观察当各种电参数变化时, 原生质体电介质电泳、珠串及融合的变化情况。未加电场时悬浮在电极间的原生质体呈散乱的随机分布状态 (图 1: 1), 加上 0.5MHz 的正弦波电场后, 随正弦波峰值电压增加原生质体移动, 在 200PV/cm 以下未见原生质体移动, 当电压达到 300PV/cm 后原生质体发生明显的电介质电泳的移动, 随着电压增加移动速度加快原生质体靠近而发生串珠, 电压为 400PV/cm 时 2—5 分钟即形成较长的串珠 (图 1: 2), 当电压增加到 500PV/cm 以上有部分原生质体回旋流动不停, 少数原生质体变形。诱导原生质体发生珠串的正弦波电场以 0.5MHz, 400—500PV/cm 较合适。方形电脉冲波宽 50μs, 峰值电压小于 4000PV/cm 时电激后观察到的融合子较少。在 5000—6000PV/cm 电激时, 当加 1—2 个脉冲后即可观察到原生质体的融合 (图 1: 3), 加 5 个脉冲后观察到由多个原生质体融合成的大融合子 (图 1: 4), 而大于 6000PV/cm 的方形脉冲电激时观察到多数已串珠的原生质体弹跳散开不发生融合。所以较合适的电激融合的方形脉冲

的峰值电压为 5000—6000PV/cm。以下的实验用 0.5MHz, 500PV/cm 的正弦波使原生质体串珠, 用 50 μ s, 6000PV/cm 的方形脉冲电激串珠的原生质体融合, 均得到较好的实际结果。

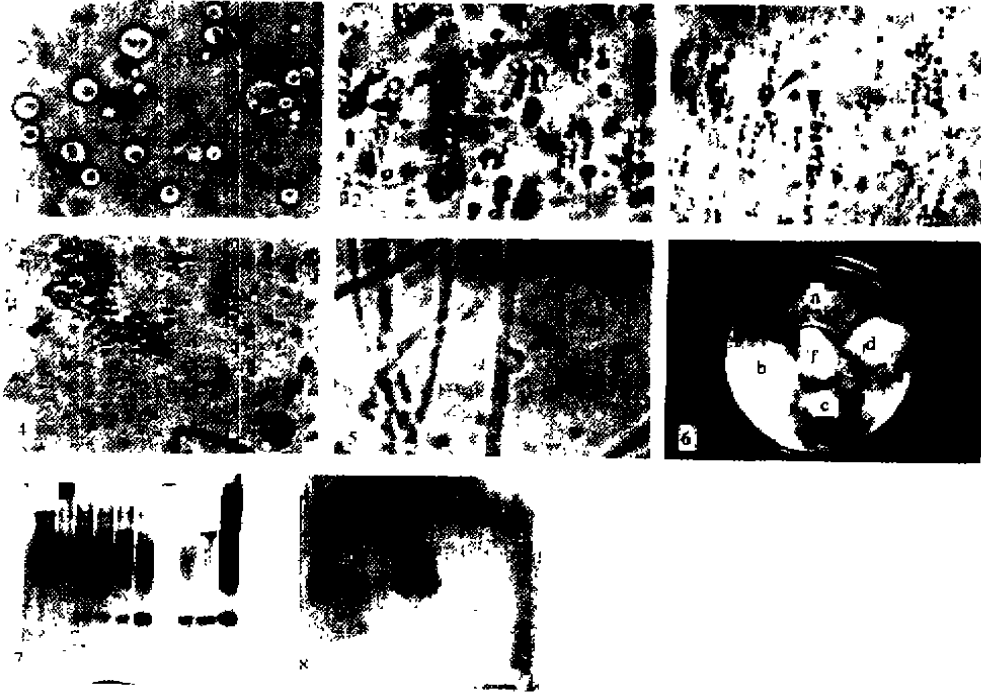


图 1. 1.未加电场的原生质体 ($\times 520$); 2.加正弦波电场后电介电泳聚集的原生质体的串珠 ($\times 260$); 3.加 1—2 个方形单脉冲后形成的融合子 (\downarrow 所示, $\times 200$); 4.加 5 个方形单脉冲后形成的大融合子 (\downarrow 所示, $\times 200$); 5.融合菌丝的锁状联合 (\downarrow 所示, $\times 520$); 6.融合菌株和亲本的拮抗 (a, 57 b, 579 c, Cg d, CD f, 融合菌株); 7.5C 融合菌株和亲本菌丝的过氧化物同工酶电泳谱 (从左到右: 1, 57 2, 579 3—8, 融合菌株 9, CD 10, Cg); 8.5C 融合菌株和亲本菌丝的酯酶同工酶电泳谱 (样品编号同 7)。

Fig.1 1. Protoplasts before applying electric field ($\times 520$); 2. Pearl chains of protoplasts collected by dielectrophoresis with a sine wave electric field ($\times 260$); 3. Fusants formed after applying 1—2 Single square pulses (shown by \downarrow , $\times 200$); 4. Large fusants formed after applying 5 single square pulses (shown by \downarrow , $\times 200$); 5. Clamp connection of fusant hyphae (shown by \downarrow , $\times 520$); 6. Antagonistic action of fusant strain and parents (a, 57 b, 579 c, Cg d, CD f, fusant); 7. Electrophoretogram of peroxidase isoenzyme of fusant 5C and parent mycelia (from left to right: 1, 57 2, 579 3—8, fusants 9, CD 10, Cg); 8. Electrophoretogram of esterase isoenzyme of fusant 5C and parent mycelia (sample No. same as 7).

2. 电融合产生较多的融合菌株

用上述较合适的电参数进行了香菇单核菌株 579 与美味侧耳单核菌株 CD、香菇单核菌株 579 与平菇单核菌株 PD 两个组合的电融合试验。电融合处理后培养成菌落, 分离单个菌落培养成菌株。用显微镜检查了 579 与 CD 融合 (5C) 的 104 个菌株的菌丝, 其中有 64 株的菌丝具有锁状联合, 融合菌株产生的频率为 61.53%。随机抽样检

查了 579 与 PD 融合 (5P) 的 89 个菌株的菌丝, 29 株菌丝有锁状联合, 融合菌株产生的频率为 32.58%。融合菌株产生的频率不等于原生质体的融合率, 参与组成一个融合子的原生质体数不可能相等, 融合子不是都能长成菌株, 能长成菌株的只能是融合子的一部分。但是融合菌株产生频率仍能反应出融合效率的高低。电融合能有这样高的融合效率是远远优越于其它融合方法的。

电融合法只需把制备好的两个种的原生质体混匀后加在电融合小室内的两个电极间, 施加合适的正弦波电场 3—5 分钟使其串珠, 再用方形单脉冲电激 3—5 次即完成融合过程。与 PEG 融合法相比较, 原生质体未接触到 PEG 等化学试剂, 避免了原生质体受药物毒害以及多次洗涤除去 PEG 等烦琐操作对原生质体的损伤, 同时缩短了融合处理的时间, 这些都表明电融合法优越于其它化学试剂诱导融合的方法。

3. 融合菌株的分析

(1) 融合菌株的双核菌丝具有锁状联合 利用单核菌株的原生质体进行融合, 选择菌丝具有锁状联合的双核菌株, 选择过程本身就是一次初步鉴定。只有融合了的融合子产生的菌株才可能是双核菌株, 只有双核菌丝才能形成锁状联合 (图 1: 5)。菌丝具有锁状联合的菌株即是融合菌株。

(2) 融合菌株与亲本菌株有拮抗作用 不同菌种的菌丝生长相遇时表现出拮抗反应。融合菌株的基因发生了重组具有了新的遗传特性, 应该对亲本菌株表现出拮抗作用。测定了 30 株 5C 融合菌株及 13 株 5P 融合菌株与亲本的拮抗反应。各融合菌株均对亲本有不同的拮抗反应, 各融合菌株都至少对一个亲本有明显的拮抗反应, 对其它亲本有不同程度的反应, 也有的对两个亲本有强烈的拮抗反应。图 1: 6 显示了 5C₁₆ (f) 融合菌株对 4 个亲本不同的拮抗反应, 它对双核菌丝的亲本 57 (a) 及 Cg (C) 的拮抗反应较强, 形成了明显的拮抗线, 而对单核亲本 579 (b) 及 CD (d) 的拮抗反应不明显。融合菌株与亲本有不同的拮抗反应说明融合菌株有了不同程度的变异。

(3) 融合菌株同工酶谱不同于亲本的同工酶谱 根据遗传学的中心法则, 酶蛋白是基因表达的最初产物, 融合菌株如果发生了基因重组就应该在基因表达的第一产物同工酶上有所表现。测定了 18 个香菇和美味侧耳的融合菌株 (5C) 及 13 个香菇和平菇的融合菌株 (5P) 在同样培养条件下菌丝的酯酶和过氧化物同工酶的酶谱与亲本作了比较。所测定的融合菌株同工酶的酶带数和各条带的迁移率都没有与亲本完全相同的酶谱, 也没有表现亲本酶带简单加和的酶谱。同工酶谱发生了不同的变化表明融合菌株的基因发生了不同的重组。而各融合菌株的同工酶谱又各不相同。5C 融合菌株的过氧化物同工酶谱 (图 1: 7 (3—8)) 至少可以分成 5 类。5C 菌株的酯酶同工酶谱 (图 1: 8) 也表现类似的情况。5P 的 13 株融合菌株的不同的同工酶谱至少也可以分成 3 类, 这只是大体上的情况, 每类同工酶谱中各菌株的酶谱还存在着差异。融合菌株酶谱变化的多样性表明融合菌株间基因重组的多样性。可能提供较多的遗传变异。

单核菌丝原生质体电融合挑选锁状联合获得的融合菌株表现出与亲本有不同程度的拮抗作用, 有与亲本不同的酯酶和过氧化物同工酶酶谱说明是来自异核的融合子, 是融合菌株。各融合菌株间拮抗作用的不同及同工酶谱的多样性表明各融合菌株具有遗传变异的多样性为选择优良的融合菌株提供了可能。

所选出的融合菌株结菇情况及子实体形态特征等,有待栽培试验中进行观察研究。

参考文献

- (1) Peberdy J F. Fungi without coats—Protoplasts as tools for mycological research. *Mycol Res* 1989; 93 (1): 1—20
- (2) Kao K N, Michayluk M R. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 1974; 115: 355—367
- (3) Keller W A, Melchers G. The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z Naturforsch* 1973; 28c: 737—741
- (4) Kawasumi T, Baga T, Yanagi S O. Protoplast fusion of incompatibility mating type combinations of *Lentinus edodes* (shiitake) auxotrophs. *Agric Biol Chem* 1988; 52 (12): 3197—3199
- (5) 彭卫宪, 陆大京. 用灭活原生质体融合进行高温香菇育种. *真菌学报* 1987; 6 (3): 184—192
- (6) Toyomasu T, K Mori. Intra—and interspecific protoplast fusion between some *Pleurotus* species. *Agric Biol Chem* 1987; 51 (3): 935—937
- (7) Lo Xinchang, Chen G, Yang Singmei. Interspecific protoplast fusion between *Auricularia auricula* and *A. polytricha*. *Mushroom Biotechnology* Ed. Fan Qingsheng et al. Nanjing: JSTEC 1989; 309—313
- (8) 钱选. 细胞工程的又一重大进展——电融合技术. *生物科学动态* 1985; (3): 7—15
- (9) Zimmermann U, Sheurich P. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta* 1981; 151: 26—32
- (10) 张鉴铭, 郑玉萍, 陈梅英等. 尖顶羊肚菌原生质体的分离及再生. *云南植物研究* 1989; 11 (4): 449—452