食用菌原生质体研究进展

杨崇林 张鉴铭

(中国科学院昆明植物研究所 650204)

自从50年代后期开展酶法分离酿酒酵母和粗糙脉孢菌的原生质体以来,在工业酵母、丝状真菌方面,经过30多年的探索和实践,以原生质体为基础的生物工程技术已得到大规模的应用和发展;而对具有大型子实体的高等真菌的原生质体研究则起步较晚。高等担子菌原生质体的研究始于1972年对裂褶菌(*Schizophyllum commune*)的原生质体分离^[1],真正大规模的研究则是近10年来的事。食用菌原生质体的最大优点之一就是其全能性较易得到体现,从而为以原生质体为媒介的生物技术提供了极大的可行性。本文拟对近年来食用菌原生质体的研究作一简明回顾。

一、原生质体分离

迄今为止,约有60多种食用菌的原生质体分离培养已有报道。1985年前报道的种类已被综述过^[2],近年来的此类研究大致如表1。

常用的原生质体分离材料为菌丝体和担孢子。原生质体通常形成于稍膨胀的菌丝尖端壁孔或横隔断裂处;担孢子的萌发孔也是其形成途径之一。菌丝体年龄是影响原生质体产量和稳定性的一个直接因素,幼龄菌丝壁薄易酶解,老龄菌丝则反之。此外菌丝体培养方式也有一定影响,如由固体培养的菌丝体形成的尖顶羊肚菌的原生质体,稳定性较来源于液体培养的菌丝体的要差^[11],香菇等的原生质体产量可因在菌丝体培养基中加入一种纸浆废液而显著提高^[8]。菌丝体较担孢子易获得原生质体,但后者所获得的原生质体在形态大小、生理生

化特性上更为一致。

食用菌细胞壁的主要成分为几丁质和其他多聚糖,只有用与之相应的酶类才能脱除。市售酶往往包含多种成分,对不同种类菌丝体的分离效果常不一样,且不同商品来源的同一类酶,其活力也存在差异。酶种类、浓度及组合方式等都是影响原生质体产量的重要因素。在长根鬼伞中,使用纤维素酶、几丁质酶及分解酶6000的混合酶液时,原生质体产量大幅度超过单独使用其中任何一种时的产量^[6]。在分离尖顶羊肚菌原生质体时,使用多种酶的组合同样也得到了相似的结果^[11]。

有机和无机渗透稳定剂均有利于食用菌原生质体的形成,使用时因不同种类而异。渗透稳定剂影响原生质体形成的机理尚不很清楚,其可能性之一就是细胞壁溶解酶活性的调节作用。如几丁质酶需要一定的 Ca^{2+} 浓度才能达到最佳活性状态。Yu, M. Y和S. T Chang发现单价阴离子和阳离子盐能够提高几丁质酶活性,二价或三价盐类会引起明显抑制作用,磷酸盐则有严重阻遏作用^[18]。这一现象表明只有在适当的电化学状态下几丁质酶活性才能达到最高。 α -葡聚糖酶(α -glucanase)对无机和有机渗透稳定剂均比较稳定。此外渗透稳定剂还可能影响原生质体的相对密度,如 $MgSO_4$ 能够增加裂褶菌高度液泡化的原生质体比例,在KCl、NaCl、山梨醇、甘露醇溶液中受重力作用即可沉淀,而在相同浓度的蔗糖溶液中仍呈悬浮状态,说明原生质体与分离混合液有相似的密度^[1]。这一特性为原生质体的纯化提供

表 1 近年来已进行过原生质体分离的食用菌

种 名	酶 系 统	参 考 文 献
光木耳 (<i>Auricularia auricula</i>)	新生酶 234	(3)
毛木耳 (<i>A. polytricha</i>)	新生酶 234	(3)
灰盖鬼伞 (<i>Coprinus cinereus</i>)	纤维素酶 R-10, 几丁质酶 分解酶 5000, 葡糖苷酸酶	(4)
长根鬼伞 (<i>C. macrohizus</i>)	纤维素酶, 几丁质酶 新生酶 234 等	(5)
透明鬼伞 (<i>C. pellucidus</i>)	溶解酶 3 号, 几丁质酶 分解酶 5000, 葡糖苷酸酶	(4)
灵芝 (<i>Ganoderma lucidum</i>)	新生酶 234 葡糖苷酸酶	(6)
双色蜡蘑 (<i>Laccaria bicolor</i>)	新生酶 234	(7)
香菇 (<i>Lentinus edodes</i>)	崩溃酶, 纤维素酶 RS 葡糖苷酸酶	(8)
榆干离褶伞 (<i>Lyophyllum ulmarius</i>)	新生酶 234, 葡糖苷酸酶 葡聚糖酶	(9)
羊肚菌 (<i>Morchella esculenta</i>)	几丁质酶, 纤维素酶 分解酶	(10)
尖顶羊肚菌 (<i>M. conica</i>)	纤维素酶 R-10 崩溃酶, 蜗牛酶, 半纤维素酶	(11)
光帽鳞伞 (<i>Pholiota nameko</i>)	纤维素酶 RS 葡糖苷酸酶	(12)
白黄侧耳 (<i>Pleurotus cornucopiae</i>)	纤维素酶, 分解酶 几丁质酶	(13)
佛罗里达侧耳 (<i>P. florida</i>)	新生酶 234	(14)
环柄侧耳 (<i>P. sajor-caju</i>)	新生酶 234	(15)
灰白侧耳 (<i>P. spodeleucus</i>)	新生酶 234	(16)
草菇 (<i>Volvariella volvacea</i>)	新生酶 234	(17)

了依据。

酶解温度、pH 和酶解时间也是影响原生质体形成的因素。不利的高温和低温会引起酶活力下降或原生质体内细胞器凝结乃至膜稳定性的降低; 过酸或过碱会影响酶蛋白的构象甚至使酶变性失活。多数食用菌原生质体分离温度在 30℃ 左右, pH 范围则有较大差异。原生质体产量达到最高时所需要的时间, 是上述各因素综合作用的结果, 采用菌丝体作分离材料时一般在 3—7 小时, 而采用担孢子则要稍长一点。

二、原生质体再生

真菌原生质体的再生包含两个过程: 其一,

原生质体再生细胞壁; 其二, 已再生壁的细胞经细胞分裂回复到原菌丝状态。由于再生过程表现的众多现象和特征, 原生质体已在许多研究领域中得到广泛应用。尤其在细胞壁的生物合成方面, 已经证明在裸露的原生质膜上壁的形成过程不同于处于旺盛生长中菌丝尖端细胞的细胞壁合成。在正常菌丝的细胞壁合成过程中, 新的大分子物质的准确插入和定位由已存在的结构提供信息; 而原生质体上壁的形成是由本身带有结构决定信息的大分子聚合物自我聚集的结果, 这种细胞壁往往缺乏正常菌丝细胞壁的机械特性, 在低渗溶液中易破裂。

过去认为, 从菌丝分离的原生质体有两种再生方式: 第一, 原生质体产生类似由出芽细

胞形成的念珠状畸形萌发管,于其顶端长出正常菌丝;第二,原生质体先形成细胞壁并保持圆形,称初级细胞,再由其产生萌发管。最近张鉴铭等在培养美味牛肝菌(*Boletus edulis*)菌丝原生质体时,发现一种新的再生途径^[10]:原生质体先膨大变形成粗棒状的“粗菌丝”,再于其顶端分化出“细菌丝”(正常形态的菌丝)。这一特殊方式可能类似于高等植物原生质体再生细胞的脱分化和再分化过程。

从理论上讲,含有一个完整核的任何真菌的原生质体,都具有回复成一个完整结构和功能的细胞的修复潜能。然而由于再生过程中的一些环节不能完成,并不是每个原生质体都能实现其全能性的。有两方面因素可对再生产生影响,一是原生质体所处的生理状态;另一方面主要是外界因素,即培养条件如培养方式、培养基成分、渗透稳定剂种类、浓度、培养温度及pH等。值得注意的是在原生质体分离时,

往往会造成细胞核丢失。在一些试验中,有核原生质体的比例甚至不超过50%^[6]。此外,原生质体来源不同也会造成再生能力的差异,如来源于菌丝基部的原生质体,其再生能力可能要差一些,甚至没有再生能力。

三、体细胞杂交

体细胞杂交即原生质体融合,可以使细胞整体基因组(核基因、线粒体基因及胞质基因)得以转移,从而扩大了基因重组的范围;在食用菌育种上克服了有性杂交育种的局限性,使远缘杂交、相同交配型杂交成为可能。目前食用菌体细胞杂交的范围有种内、种间、属间甚至有目间的原生质体融合(如表2)。在融合方法上,PEG法仍是主要的;但电融合在近年来越来越受到重视,其最大优点就是能快速、简便、高频率地进行细胞融合而对原生质体毒性较小。

表2 近年来有关食用菌原生质体融合的报道

种名	融合类型	文献
光木耳 × 毛木耳 (<i>A. auricularia</i> × <i>A. polytricha</i>)	种间	(20)
树舌 × 灵芝 (<i>G. applanatum</i> × <i>G. lucidum</i>)	种间	(21)
灵芝 × 糙皮侧耳 (<i>G. lucidum</i> × <i>P. ostreatus</i>)	目间	(22)
香菇 × 近裸香菇 (<i>L. edodes</i> × <i>L. subnudus</i>)	种间	(23)
粘盖小奥德蘑 (<i>Oudemansiella mucida</i>)	种内	(24)
佛罗里达侧耳 × 糙皮侧耳 (<i>P. florida</i> × <i>P. ostreatus</i>)	种间	(25)
佛罗里达侧耳 × 环柄侧耳 (<i>P. florida</i> × <i>P. sajor-caju</i>)	种间	(26)
糙皮侧耳 × 萨门氏侧耳 (<i>P. ostreatus</i> × <i>P. salmoneo-straminens</i>)	种间	(27)

细胞融合的关键之一是如何选择融合子。常用的方法是先将融合亲本进行遗传标记,如获得营养缺陷型突变体或抗药性突变体,通过互补作用选择出融合子。此外,亲本的自然特性也可作为选择特征,如担子菌纲的许多食用菌,双核菌丝有锁状联合而单核菌丝没有。利

用这一特性可选择出一部分融合子。彭卫宪等还利用温度差异选择出了香菇与近裸香菇的种间融合子^[23]。

细胞学方法、生化方法、子实体形态特征等可用作融合子的分析鉴定。融合子在细胞学上的表现并不呈单一的模式,如萨门氏侧耳与

糙皮侧耳的融合体, 菌丝体表现为单核^[27], 表明细胞间发生了核融合且有丝分裂并未导致异核体的形成。而许多研究者发现融合子的菌丝体既有单核又有双核细胞, 这一现象较难解释。常用作鉴定融合子的生化方法是同工酶酶谱, 据已有报道看, 融合子表现的酶带并非双亲酶带的简单叠加, 而是常有新的酶带出现。显然是亲本基因组之间相互作用的结果。在子实体形态特征上, 融合子的表现也是多种多样的。总之, 细胞融合的多样性以及异源基因组之间相互作用的多样性, 导致了融合子在遗传特征上的多样性和复杂性, 为通过体细胞杂交选择良种提供了较大的范围。

五、以原生质体为受体的细胞器转移及基因转化

这方面的研究现阶段进行得较少。细胞器转移仅见于 Yoo, Young-Bok 等将从杨田头菇 (*Agrocybe aegerita*) 菌丝中分离的细胞核导入佛罗里达侧耳原生质体的研究^[28], 结果出现三种类型的转移产物, 形成的子实体与杨田头菇相似。利用原生质体作为受体的基因转化见于对裂褶菌^[29]和灰盖 龟伞^[30]原生质体转化的报道。此两者均是以色氨酸缺陷型的原生质体为受体 (*trp1*), 将含有相应 *TRP1* 序列的质粒 DNA 导入, 结果使缺陷型转化为原养型。 *trp*⁺ 的转化子在有丝分裂、减数分裂中均保持稳定, 表明转化 DNA 是稳定的。

以载体为媒介的基因转化为真菌生物学许多领域的研究开辟了一条非常有益的途径, 如对启动子的研究及进行外源基因表达等。通过细胞器移植还可进行细胞器起源、细胞起源、细胞遗传修饰及核质关系等方面的研究。鉴于食用菌原生质体再生能力较强的特点, 这一方面的关键显然在于细胞器及目的基因的获取。一旦能够建立起一套有效的获取方法, 那么这一应用前景将是十分广阔的。

六、结 语

对食用菌原生质体的研究, 一方面为食用

菌生物学的基础理论提供了新的研究方法和途径; 另一方面这一技术的不断成熟, 又为食用菌品种改良开辟了新的领域, 特别是在进行野生稀有食用菌的驯化时, 体细胞杂交和基因转移更是独辟蹊径, 具有较大的应用价值。因此对食用菌原生质体的进一步研究, 必将会导致食用菌领域的一场新的变革。

摘 要

本文从原生质体分离、再生、体细胞杂交及细胞器转移和基因转化等几方面概述了近年来国内外食用菌原生质体的研究动态和进展。

参 考 文 献

- [1] De Vries et al., 1972, *J Gen. Microbiol.*, 73: 13—22.
- [2] 大政正武, 1985, 农业および园艺, 60: 200—204.
- [3] 罗信昌, 1987, 中国食用菌, 1: 3—6.
- [4] Morinaga, T et al., 1985, *Agric. Biol. Chem.*, 49: 523—524.
- [5] Yanagi, S. O et al., 1985, *Agric. Biol. Chem.*, 49: 171—179.
- [6] Choi, S. H et al., 1987, *Arch. Pharmaceutics. Res.*, 10: 158—164.
- [7] Kropp et al., 1986, *Can. J Bot.*, 64: 1224—1226.
- [8] Kawasumi, T et al., 1987, *Agric. Biol. Chem.*, 15: 1649—1656.
- [9] Yoo, Y. B et al., 1987, *Korean J Mycol.*, 15 (1): 14—18.
- [10] Moriguchi, M et al., 1985, *Agric. Biol. Chem.*, 49: 2791—2793.
- [11] 张鉴铭等, 1989, 云南植物研究, 11(4): 449—452.
- [12] Ohmasa, M et al., 1987, *Bull. For. For. Prod. Res. Inst.*, 0: 105—110.
- [13] Wakabayashi, Y et al., 1985, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 328—330.
- [14] Yoo, Y. B et al., 1985, *Korean J Mycol.*, 13 (2): 79—82.
- [15] Go, S. J et al., 1985, *Korean J Mycol.*, 13 (3): 169—177.
- [16] Yoo, Y. B et al., 1987, *Korean J Mycol.*, 15 (1): 19—22.
- [17] Mukhjee, M et al., 1986, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 1412—1414.
- [18] Yu, M. Y & S. T Chang, 1987, *Mircen.*

- J Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 3 (2): 161—168.
- [19] 张鉴铭等, 1990, 云南植物研究, 12 (4): 467—469.
- [20] 杨国良等, 1990, 中国食用菌, 3: 13—14.
- [21] Park, Y. D et al., 1988, *Korean J Mycol.*, 16 (1): 79—86.
- [22] Yoo, Y. B et al., 1989, *Korean J Mycol.*, 17 (3): 119—123.
- [23] 彭卫宪, 陆大京, 1987, 真菌学报, 6(3): 184—192.
- [24] Homolk, L., 1988, *Folia Microbiologia*, 33: 298—308.
- [25] Yoo, Y. B et al., 1986, *Korean J Mycol.*, 14 (1): 9—15.
- [26] 赵明亮等, 1990, 朱世瑛等主编, 食用菌新技术汇编, 大连理工大学出版社, 63—68.
- [27] Toyomasu, T et al., 1986, *Agric. Biol. Chem.*, 50: 223—225.
- [28] Yoo, Y. B et al., 1989, *Korean J Mycol.*, 17 (3): 114—118.
- [29] Alfredo M-R et al., 1986, *Mol. Gen. Genet.*, 205: 103—106.
- [30] Bininger, D. M et al., 1987, *EMBO Journal*, 6: 835—840.

哺乳类早期胚胎发育阻滞的形成与突破

李逸平 左嘉睿

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

在离体培养哺乳类(包括人)着床前早期胚胎的时候, 人们都普遍地发现这样的事实: 在化学组份确定的培养基中, 早期胚胎往往不能完成从受精卵到囊胚的发育全过程, 而停顿在某个特定发育时期。我们把这种现象称作“发育阻滞(block of development)”。

早期胚胎发育阻滞的时间随种的不同而异, 例如, 小鼠和大鼠早期胚胎发育阻滞发生在2细胞期, 金黄地鼠发生在2—8细胞期, 猪发生在4细胞期, 人发生在4—8细胞期, 猕猴、牛、绵羊和山羊都发生在8—16细胞期, 兔发生在桑椹胚期^[1-3]。

近年来, 有关哺乳类早期胚胎发育阻滞机理以及突破发育阻滞方面的研究异常活跃, 各种观点纷呈。本文拟就高等哺乳动物特别是小鼠早期胚胎离体发育阻滞及其突破机理的研究近况作初步概述。

一、发生在细胞周期 G_2 相的事件

哺乳动物卵母细胞在成熟之前一直都停留在细胞周期的 G_2/M 相; 在内源激素的调节

下, 才由 G_2/M 相进入M相, 且停顿在M相中期。一旦遇到精子, 实现受精, 由M相跨入 G_1 相。随着第二极体的形成, 标志着 G_1 相的开始。在此期间, 源自精子的染色体发生了重大改组, 其中包括精子的鱼精蛋白(protamines)被卵母细胞的组蛋白(histones)取代等。整个合子阶段可视作胚胎发育过程的第一细胞周期。

对小鼠体内正常情况下的早期胚胎细胞周期各时相进行剖折(表1), 不难发现在最初的四个细胞周期中 $G_2 + M$ 相的变异性较大, 其中第一、第二细胞周期的尤为显著; 第二细胞周期的 $G_2 + M$ 相持续时间最长。变异大除了可能反映出作为研究材料的小鼠品系的差异性外, 更主要的是它反映了处于第一和第二细胞周期 G_2 相的胚胎可能对于环境压力非常敏感。有人进行过这样的试验: 在第一和第二细胞周期S相的任何时候, 将 37°C 的环境温度下调至 20°C 时, 就会导致体外培养胚胎前两个细胞周期的 $G_2 + M$ 相时间延长; 如果避免这种温度下降, 那么第一和第二细胞周期的 $G_2 +$