

20-21

桃红平菇, 原生质体, 突变体

桃红平菇原生质体诱导营养缺陷型突变体

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)
杨崇林 张基铭

摘要
从桃红平菇单核菌丝分离出原生质体铺于含0.6mol/l蔗糖的CM表面, 经紫外线处理一定时间后, 培养7—10天后长出的菌落转于MM之上, 在其上生长十分缓慢或停止的菌落通过各种培养基加酶测其营养需求, 最后得到一个需要补充丙氨酸和天冬氨酸才能正常生长的双缺突变体。试验表明, 该突变体能很好地分离出原生质体, 且在含0.6mol/l蔗糖的MM上不能再生, 因而具有较好的应用前景。
关键词: 桃红平菇 原生质体 营养缺陷型突变体

营养缺陷型突变体在细胞融合、细胞器移植、基因定位、基因转化等遗传研究中具有重要地位。在食用菌方面, 目前国内报道的该类突变体产生方法多为用紫外线

处理孢子。本文报道利用紫外线处理桃红平菇原生质体获得营养缺陷型突变体的试验。

材料和方法

1. 实验材料: 桃红平菇 (*Pleurotus salmonicolor*) 从江西宜春食用菌研究所购得。从其子实体收集担孢子萌发后获得单核菌株Ps—6, 用作分离原生质体。

2. 培养基: 完全培养基 (CM complete medium) 为马铃薯综合培养基; 基本培养基 (MM minimal medium) 同Testo TOYOMAJU的培养基[1], 其中的 $(NH_4)_2HPO_4$ 改为 $NH_4H_2PO_4$ 。

3. 原生质体分离及诱变处理: 单核菌丝在液体CM中静置培养5—7天后, 取出用0.5mol/l的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 洗净, 于30℃下静置酶解。脱壁酶同张基铭等在分离尖顶羊肚菌原生质体时所采用的

2号酶液[2]。4—5小时后用 G_2 漏斗滤除残余菌丝, 滤液3000转/分离心5—10分钟收集原生质体, 再悬浮于0.5mol/l的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 中, 计数后铺于含0.6mol/l蔗糖的固体CM和MM表面, 在20W紫外灯下距离13cm处理一定时间后, 在暗中静置过夜, 尔后于25℃下保湿培养。其中培养于MM上的原生质体, 经8天左右后再于其上铺一层含1%水解酪蛋白的MM以使未死亡原生质体得以再生。

4. 营养缺陷型突变体的筛选: 经处理后的原生质体在CM上或添加水解酪蛋白的MM上长出菌落后, 将其转于MM之上, 5—7天后弃去表现生长的菌落, 余者再转于CM上使其增大到一定程度后, 分别在添加水解酪蛋白或碱基的MM上检测其生长状况, 进一步用相应的氨基酸或碱基测其营养需要, 最后根据上述推断, 在含其所缺失物的MM上确证。表一为检测营养需要的氨基酸组合。

表1 用以检测缺陷型的氨基酸组合 (100μg/ml)

Table 1. Combinations of amino acids to detect the auxotrophic type of colonies (100μg/ml)					
No.	1	2	3	4	5
6	Ala	His	Phe	Am	Lys
7	Gly	Thr	Tyr	Ile	Arg
8	Ser	Glu	Trp	Val	Met
9	Asp	Pro	Leu	Cys	Pro-OH

结果和讨论

经处理后的原生质体在CM上培养5—7天可出现肉眼可见菌落。在MM上培养8天后仍不能再生, 加入含水解酪蛋白的MM后3—4天可使未死亡原生质体生长出菌落。此时可将菌落转于MM之上初选突变体, 继而进一步检测。整个试验的突变体筛选结果如表二。

在本试验中, 分别从各个处理再生的菌落中挑选突变体, 通过转移大量菌落后的筛选, 结果从处理45秒后再生的角落中获得一个能在补充1%水解酪蛋白的MM上正常生长的菌落, 经检测发现其仅

表2 突变体筛选结果					
紫外线处理时间 (秒)	原生质体再生率 %	转于MM上的 菌落数	在MM上停止生 长的菌落数	稳定突变体数	备 注
irradiated time by U.V (s)	protoplast regenera- tion frequency%	colonies transplanted on MM	colonies showing little growth	stable mutant	note
0	1.8				原生质体 培养于 CM上
30	0.08	1016	2	0	
45	0.04	420	2	1	
60	— ^a	422	29	0	原生质体 培养于 MM上
80	— ^a	61	5	0	
总计 (total)		1919	38	1	

注: a. 未加水解酪蛋白前无菌落再生。
note: a. no colony formed before casein hydrolysate was added

能在含第一组氨基酸的MM上生长,最后确定其为需要补充丙氨酸和天冬氨酸才能在MM上恢复正常生长的双缺陷营养缺陷型突变体。该突变体经过三次转代后在MM上仍未见生长;其菌丝体在液体CM中静置培养6—7天可很好地分离出原生质体。在含0.6mol/l蔗糖的CM上,原生质体再生率为1.9%,在含相同渗透稳定剂的MM上不能再生,表明该突变体是稳定的。

试验发现,紫外线在短时间内可引起原生质体再生率的急剧下降(如表二),表明紫外线对原生质体有较强的致死作用,因而通过紫外线辐射原生质体是有效的诱变手段。如何高效率地获得营养缺陷型突变体的关键在于选择合适的辐射剂量。本试验经30秒紫外线处理后的原生质体再生于CM上的菌落,虽经大量选择,仍未获得营养缺陷型突变体。经60秒、90秒处理后培养于MM上的原生质体,在未加入水解酪蛋白前不能再生出菌落,然而加入水解酪蛋白后生长出的菌落再被转于MM上时,

多数能正常生长,即使是初步表现生长停止的菌落,在进一步检测时也部分恢复正常生长;余者在CM上或添加其它营养补充物的MM上生长十分缓慢,菌落发育不良,很难选出具有正常形态和生长速度的营养缺陷型突变体。这一现象很可能是由于不当的辐射剂量所引起的。

利用紫外线处理原生质体以获得营养缺陷型突变体,可以避免在处理担孢子时受到的材料限制,因为获取担孢子往往要受时间等因素的制约。桃红平菇营养缺陷型突变体的获得,为今后利用该品种通过细胞融合培育新品种提供了有利条件。

参考文献

- [1] Testo Toyomasu et al., 1988, interspecific protoplast fusion between *Pleurotus ostreatus* and *P. salmoneo-stramineus*. *Agrie Biol Chem* 59(1): 223—225.
- [2] 张鉴铭, 郑玉萍, 陈梅英等, 1989, 尖顶羊肚菌原生质体的分离及再生. 云南植物研究11(4): 449—452.

Auxotrophic Mutant Induction From the Protoplasts of *Pleurotus salmoneo-stramineus*

Yang Chonglin, Zhang Jianming

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract

Protoplasts isolated from monokaryotic mycelia of *Pleurotus salmoneo-stramineus* were spread on CM containing 0.6 mol/l sucrose and irradiated by U.V. After 7—10 days, the regenerated colonies were transplanted on MM and those showing little growth were detected further with various kind of nutritional requirements. One auxotrophic mutant, double deficient in Ala and Asp, was obtained at last, from which a good protoplast yield could be obtained. It will be useful in protoplast fusion study because its protoplasts can not regenerate on MM containing 0.6 mol/l sucrose.

Key words: *Pleurotus salmoneo-stramineus*, protoplast, auxotrophic mutant.

21-23

食用真菌基因工程实验技术 (连载)

吕作舟

(华中农业大学 武汉 430070)

S646.032

实验(三)琼脂糖凝胶电泳检测总DNA分子量

构建基因组文库,首先必须制备分子量大于50 kb(千碱基对)的总DNA,且要求DNA的纯度达到可被限制性内切酶(Restriction endonuclease, 简称RE)酶切的水平。本实验采用水平式琼脂糖凝胶电泳(Agarose gel electrophoresis)法检测实验(二)提取到的平菇总DNA的纯度、浓度与分子量。

实验材料:

Lambda DNA marker, SABC(华美生物工程公司)提供;

total DNA, 实验(二)所得平菇总DNA;

6×Loading buffer(载样缓冲液):甘油5ml, 40×TBE缓冲液250μl, 溴酚蓝饱和溶液1ml, 10%二甲苯蓝溶液1ml, ddH₂O 8.75ml。混匀后按1ml分装, -20℃贮存备用;

EB(溴化乙锭溶液)0.5—1.0mg/ml;

Agarose(琼脂糖), Sigma产品;

10×TBE buffer, 每升含: Tris108.0g, H₃BO₃55.0g, 0.5MEDTA(pH8.0)44ml。经0.11 MPa, 121℃灭菌20分钟。

仪器设备:微波炉或电炉, 紫外检测仪; 135相机(配近摄镜及橙色滤光镜各1片), DY-73型稳压电泳仪, 水平电泳槽(凝胶规格7×7.5cm), 微量进样器, tip(吸头), Eppendorf管(1.5ml离

食用菌·真菌, 基因工程