

茶树菇原生质体制备及融合研究

江力, 刘国庆, 窦伟

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘要: 本实验研究茶树菇原生质体制备的影响因素及茶树菇原生质体的融合过程。结果表明, 酶、酶解时间、酶解温度、渗透压稳定剂、pH 值对原生质体的制备有显著的影响, 其中温度、pH 值对原生质体的制备影响最大。制备茶树菇原生质体的最佳条件为: 1% 纤维素酶和 1% 蜗牛酶(1:1), 酶解 4h, 酶解温度为 28℃, 渗透压稳定剂采用 pH6.0 0.6mol/L 甘露醇溶液。原生质体的融合采用 30% PEG (MW4000)溶液和 pH10.5 0.2mol/L CaCl₂ 溶液。

关键词: 茶树菇; 原生质体; 制备; 融合

Study on Preparation and Fusion of *Agrocybe aegerita* Protoplast

JIANG Li, LIU Guo-qing, DOU Wei

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: The factors affecting the preparation of *Agrocybe aegerita* protoplasts from and the fusion between the protoplasts were studied. The results showed that enzyme type, enzymolysis time, enzymolysis temperature, osmotic pressure stabilizer and pH significantly affect the preparation of protoplasts, and enzymolysis temperature and pH among them are the most important influence factors. The best preparation conditions are as follows: digesting for 4h with 1% cellulase and 1% snailase (1:1) at 28 °C and taking 0.6 mol/L mannitol solution at pH 6.0 as osmotic pressure stabilizer. Protoplast fusion is made by chemical method with 30% PEG (MW 4000) and 0.2 mol/L CaCl₂ (pH 10.5).

Key words: *Agrocybe aegerita*; protoplast; preparation; fusion

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)09-0348-04

茶树菇, 民间称之为“神菇”, 是一种高蛋白、低脂肪、集营养和保健于一身的纯天然食用菌。据国家食品质量监督检验中心测定, 其蛋白质含量高达 19.55%, 富含人体所需的天门冬氨酸、谷氨酸等 18 种氨基酸, 人体必需的 8 种氨基酸含量齐全, 并且有丰富的 B 族维生素和钾、钠、钙、镁、铁、锌等多种矿物质元素以及抗癌多糖, 有健脾止泻、抗衰老、降低胆固醇、防癌和抗癌的特殊作用, 其药用保健疗效高于其他食用菌^[1]。

我国是食用菌生产大国, 产量占世界总产量半数以上, 但很多品种在质量和单产方面与先进国家相比差距较大, 主要原因是我国食用菌菌种改良, 尤其杂交育种起步较晚、水平低, 现有栽培品种不能适应生产迅速发展之需要, 因此开发食用菌新品种是大力发展食用菌栽培业的基础^[2]。细胞融合不受种属的局限, 可实现种间生物体细胞的融合, 使远缘杂交成为可能, 尤其对于人工栽培不能出菇的珍贵资源, 利用菌丝体制备原

生质体进行杂交育种十分有利^[3]。国内在这方面的研究主要集中在以下几个种: 香菇、双孢蘑菇、金针菇、平菇、草菇、木耳、灵芝等^[4-7]。本实验研究不同因素对茶树菇原生质体分离效果的影响以及原生质体融合情况, 以期能建立茶树菇原生质体制备的优化系统, 为茶树菇细胞工程育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

茶树菇菌种由合肥南七菌种厂提供。

称取 1.0g 培养基, 加入 10ml 水充分振荡, 将附着的菌丝体离解下来, 制成菌悬液, 待用。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的制备^[8]

向菌悬液中加入 5ml 渗透压稳定剂, 然后加入 4ml 酶液(1% 纤维素酶和 1% 蜗牛酶各 2ml), 于振荡培养箱中培养 2~5h。酶解完成后, 用三层纱布过滤除去残渣

收稿日期: 2008-04-26

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(070411252X; 070411001)

作者简介: 江力(1964-), 女, 副教授, 博士, 主要从事生理生化及分子生物学研究。E-mail: jiangli@ustc.edu.cn

碎片, 将滤液分装于离心管内, 于 800r/mim 下离心 5min, 去沉淀, 将上清液于 3000r/mim 下离心 10min, 去上清液, 每管加入 1ml 渗透压稳定剂, 于 3000r/mim 下洗涤离心两次。纯化的原生质体加入 5ml 渗透压稳定剂, 打散摇匀, 显微镜下镜检、计数、拍照。

1.2.2 最佳酶解时间的确定

将 4ml 酶液 (1% 纤维素酶和 1% 蜗牛酶各 2ml) 加入菌悬液中, 加入 5ml 0.6mol/L 甘露醇溶液 (pH6.0) 充分混匀, 分别于 28℃ 下振荡酶解 2、3、4、5h 后制备原生质体, 显微镜下计数并拍照 (40×)。

1.2.3 最佳酶解温度的确定

将 4ml 酶液 (1% 纤维素酶和 1% 蜗牛酶各 2ml) 加入菌悬液中, 加入 5ml 0.6mol/L 甘露醇溶液 (pH6.0) 充分混匀, 分别于 28、34、40℃ 下振荡酶解 4h 后制备原生质体, 显微镜下计数并拍照 (40×)。

1.2.4 最佳 pH 值的确定

将 4ml 酶液 (1% 纤维素酶和 1% 蜗牛酶各 2ml) 加入菌悬液中, 加入 5ml 0.6mol/L 甘露醇溶液, 充分混匀, 分别调整 pH 值为 6.0 和 10.0, 28℃ 下振荡酶解 4h 后制备原生质体, 显微镜下计数并拍照 (40×)。

1.2.5 渗透压稳定剂的确定

将 4ml 酶液 (1% 纤维素酶和 1% 蜗牛酶各 2ml) 加入菌悬液中, 分别加入 5ml 0.6mol/L 甘露醇溶液和 5ml 0.6mol/L 蔗糖溶液, 充分混匀, 调 pH 值为 6.0, 28℃ 下振荡酶解 4h 后制备原生质体, 显微镜下计数并拍照 (40×)。

1.2.6 酶的种类的确定

分别将 4ml 1% 纤维素酶、4ml 酶液 (1% 纤维素酶和 1% 蜗牛酶各 2ml) 加入菌悬液中, 再各加入 5ml 0.6mol/L 甘露醇溶液, 充分混匀, 调 pH6.0, 28℃ 下振荡酶解 4h 后制备原生质体, 显微镜下计数并拍照 (40×)。

1.2.7 茶树菇原生质体融合

将制备好的原生质体加入含有渗透压稳定剂和钙盐的溶液内, 振荡摇匀, 用移液管吸取三滴混合液滴于载玻片上, 静置 10min 后, 滴入 30% (W/V) PEG4000 溶液 450μl, 静置 10min 后, 以渗透压稳定剂洗涤, 缓缓加入 0.5ml 的 0.2mol/L CaCl₂ 溶液 (pH10), 10min 后再加入一次, 静置 10min, 用渗透压稳定剂洗涤两次, 每次间隔 1min, 显微镜下镜检并拍照。

2 结果与分析

2.1 酶解时间对茶树菇原生质体制备的影响

由图 1 可知, 随着酶解时间的增加, 原生质体产量不断提高, 酶解时间为 4h 时, 原生质体产量最高, 达到峰值。再延长酶解时间, 原生质体产量不再提高,

反而下降。因此, 当酶解 4h 时, 细胞去壁效果最好, 此时形成的原生质体如果继续酶解, 则会导致原生质体的细胞膜发生破裂, 导致原生质体数目的下降^[9]。

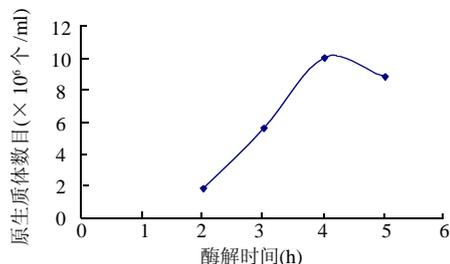


图 1 酶解时间对茶树菇原生质体制备的影响

Fig.1 Effects of enzymolysis time on protoplasts preparation of *Agrocybe aegerita*

2.2 酶解温度对茶树菇原生质体制备的影响

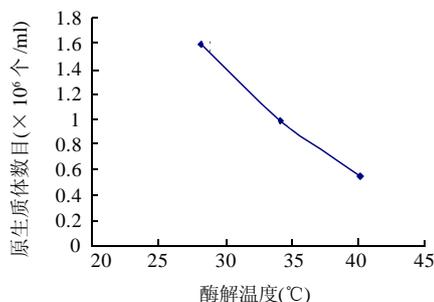


图 2 酶解温度对茶树菇原生质体制备的影响

Fig.2 Effects of enzymolysis temperature on preparation of *Agrocybe aegerita* protoplasts

由图 2 可知, 制备原生质体的最佳温度为 28℃。温度对原生质体的影响包括两方面: 一方面, 温度影响酶的活性, 一定范围内, 酶活力随着温度的升高而提高, 在最适温度之后, 温度升高酶活反而下降; 另一方面, 温度影响原生质体的稳定性, 高温容易导致原生质体的细胞质变性, 使原生质破裂^[9]。

2.3 pH 值对茶树菇原生质体制备的影响

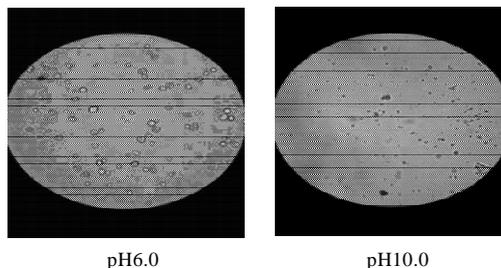


图 3 pH 值对茶树菇原生质体制备的影响

Fig.3 Effects of pH values on preparation of *Agrocybe aegerita* protoplasts

由图 3 可知, 在 pH6.0 时所得的原生质体数目最多。

pH 值对于原生质体的制备影响有两个方面：其一，pH 值影响到酶的活性，pH 值过高过低对于酶活均有不利影响，从而使细胞壁的降解不够完全；其二，pH 值对于细胞膜的稳定性具有重要影响，过高或过低的 pH 值对于细胞膜的完整性都不利，为保证原生质体的稳定，必须将细胞外环境 pH 值维持在与细胞质相近的值。

2.4 渗透压稳定剂对茶树菇原生质体制备的影响

用甘露醇作为渗透压稳定剂的效果要稍好于蔗糖的效果。由图 4 可知，渗透压稳定剂的作用是维持细胞外环境的渗透压稳定从而保证原生质体内外渗透压的平衡，进而使原生质体膜不至于皱缩或者破裂。

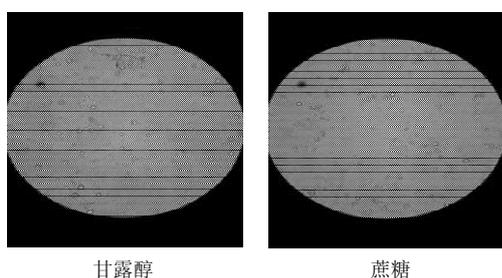


图 4 渗透压稳定剂对茶树菇原生质体制备的影响

Fig.4 Effects of osmotic pressure stabilizer on preparation of *Agrocybe aegerita* protoplasts

2.5 酶的种类对茶树菇原生质体制备的影响

单用 1% 纤维素酶处理时，细胞计数为 5.1×10^6 个/ml；而当 1% 纤维素酶与 1% 蜗牛酶联合使用时，细胞计数为 6.8×10^7 个/ml。由图 5 可知，当 1% 纤维素酶和 1% 蜗牛酶联合酶解制备原生质体时，所得效果好，其原因是：真菌细胞壁的主要成分为多糖和蛋白质，单用纤维素酶时，酶解不够彻底，而蜗牛酶含有纤维素酶、果胶酶、淀粉酶、蛋白酶等多种酶，对于降解细胞壁具有良好效果，故而使用混合酶的效果较优。

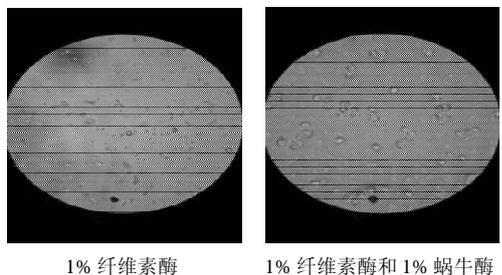


图 5 酶的种类对茶树菇原生质体制备的影响

Fig.5 Effects of enzyme type on preparation of *Agrocybe aegerita* protoplasts

2.6 茶树菇原生质体融合

按以上实验得出的最佳条件制备茶树菇原生质体，

利用 PEG 结合高 Ca^{2+} 、高 pH 值法进行茶树菇原生质体融合，如图 6 所示，可以看出四个典型阶段：前期，原生质体发生接触，细胞膜之融合过程包括间互相渗透，细胞界限开始模糊；中期，接触部位的细胞膜已经完全消失，而细胞质发生接触；后期，细胞质进一步接触，细胞中间还有明显的缝隙，表明没有完全的融合，此时细胞呈椭圆形；末期，细胞质完全融合在一起，细胞核亦发生融合，两个原生质体完全变成一个细胞。

细胞融合过程主要经过了两原生质体相互靠近、细胞桥的形成、胞质渗透、细胞核融合几个步骤。其中细胞桥的形成是细胞融合最关键的一步。细胞融合是一种无性过程，具有巨大的优势^[10-12]。

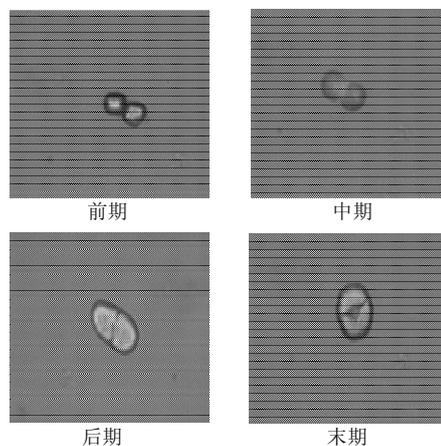


图 6 茶树菇原生质体融合过程

Fig.6 Fusion process between *Agrocybe aegerita* protoplasts

3 结论

本实验对于影响原生质体制备的多个因素(包括细胞壁消化酶、酶解时间、温度、pH 值、渗透压稳定剂)进行研究分析，并且对分离纯化的原生质体进行化学法融合，得出以下结论。

3.1 细胞壁消化酶包含 1% 的纤维素酶和 1% 的蜗牛酶时，对于茶树菇细胞的细胞壁分解较为完全。

3.2 酶解最合适时间在 4h 左右。

3.3 温度影响酶活，影响原生质体的制备，并且对原生质体稳定性造成一定影响。实验结果显示 28℃ 效果最好。

3.4 pH 值也是通过影响酶活来影响原生质体的制备。实验结果表明最适 pH 值为 6.0。

3.5 用甘露醇或蔗糖作为渗透压稳定剂差别不大，甘露醇稍优。

3.6 利用 PEG 结合高 Ca^{2+} 、高 pH 值方法进行茶树菇原

生质体融合, PEG 浓度为 30%, Ca^{2+} 浓度为 0.2mol/L、pH 值 10.0, 融合实验观察到了原生质体融合完整的全过程, 经历原生质体相互靠近、细胞桥的形成、胞质渗透、细胞核融合等步骤。

参考文献:

- [1] 徐静娟, 王树英. 茶树菇提取物的组分分析[J]. 食品工业科技, 2006, 12(3):165-167.
- [2] 邱龙新. 食用菌原生质体技术研究现状[J]. 龙岩师专学报, 2002, 20(6):49-52.
- [3] 谭琦, 潘迎捷, 汪昭月, 等. 用单原生质体交育成香菇新菌株申香 8 号[J]. 食用菌学报, 1999, 6(2):1-4.
- [4] 谭伟, 郑林用, 彭卫红. 原生质体融合技术在食用菌育种上的应用研究进展[J]. 西南农业学报, 2001, 14(4): 120-123.
- [5] 李蕤, 马守能, 刘群. 香菇菌丝原生质体制备及融合条件的研究[J]. 安徽大学学报: 自然科学版, 2001, 25(3): 99-102.
- [6] 李明. 原生质体紫外诱变选育灵芝新菌种的研究[J]. 微生物学报, 2001, 41(2): 229-233.
- [7] 罗雯, 陈志勤. 微生物原生质体融合技术及其在育种中的应用[J]. 西安联合大学学报, 2003, 6(4): 5-9.
- [8] 张志光. 真菌原生质体技术[M]. 湖南: 湖南科学技术出版社, 2003.
- [9] 江力, 孔小卫, 吴晓杰. 烟草原生质体的分离纯化[J]. 安徽大学学报: 自然科学版, 2006, 30(6): 91-94.
- [10] HAYASHI T, TANAKA H, TANAKA J, et al. Immunogenicity and therapeutic efficacy of dendritic-tumor hybrid cells generated by electrofusion[J]. *Clinical Immunology*, 2002, 104(1): 14-20.
- [11] LIANG Z R. polarized protoplast fusion between *pleurotus sajorajua* and *schizophyllum commune*[J]. *Mycosystema*, 2001, 20(1): 111-115.
- [12] VAZQUEZ F, HELUANE H, SPENCER J F T. Fusion between protoplasts of *Pichia stipitis* and isolated filamentous fungi nuclei[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 21: 32-38.