

文章编号:2095-7386(2015)04-0011-00

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2015.04.004

茯苓原生质体制备与再生条件的优化

汪琪,赵小龙,陈平

(武汉轻工大学生物与制药工程学院,湖北武汉430023)

摘要:对茯苓原生质体形成与再生条件进行研究。分别从菌丝菌龄、酶种类及浓度、酶解时间、酶解温度4个方面优化了原生质体的制备条件,从再生培养基的成分、原生质体涂布方法、酶解时间3个方面优化原生质体的再生条件。结果表明:采用培养6天的茯苓菌丝,在3.5%溶壁酶+1%崩溃酶的混合酶液中,36℃酶解2.5—3h,获得的原生质体产量最高,可达到 39.38×10^7 个/g,双层涂布再生率可达32.7%。

关键词:茯苓;原生质体;制备;再生

中图分类号:Q71

文献标识码:A

The optimized conditions of *Poria cocos* protoplasts preparation and regeneration

WANG Qi, ZHAO Xiao-long, CHEN Ping

(School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: Some factors that affected the formation and regeneration of the *Poria cocos* protoplasts were researched. Cell age, enzyme systems, digesting time and temperature were tested to optimize the condition of protoplasts preparation. Regeneration culture medium component, coating method, digesting time were studied to optimize the condition of protoplasts regeneration. The result revealed that in the condition of the mycelium cultivated for 6 days, for enzymolysis in mixed enzyme solution containing 3.5% Lywallzym and 1% Driselase at 36℃ for 2.5—3 hours, the *Poria cocos* protoplasts yield was the highest. The preparation rate can reach 39.38×10^7 /g, and the regeneration rate can reach 32.7% with double coating.

Key words: *Poria cocos*; protoplasts; preparation; regeneration

1 引言

药用茯苓是指多孔菌科茯苓属真菌茯苓(*Poria cocos*(Schw.) Wolf)的干燥菌核^[1],它是我国常用的大众药材品种之一,具有极高的药用价值和膳食营养价值,入药能够利水渗湿、益脾和胃、宁心安神。

我国是世界上唯一进行茯苓栽培的国家^[2]。近年来,对于茯苓化学、药理方面的研究比较深入,而有关其生物特性方面的文章并不多见^[3]。虽然1980年以后,有关食用菌原生质体分离的报道大量增加^[4-5],但对茯苓原生质体分离制备的系统研究较少,为了以后对茯苓在微生物方面进行更进一步的

收稿日期:2015-10-26.

作者简介:汪琪(1990-),女,硕士研究生,E-mail:694711760@qq.com.

通信作者:陈平(1958-),女,教授,E-mail:chenpingvip24@163.com.

探索,笔者对茯苓原生质体的制备进行了一些试验研究。

2 材料与试剂

2.1 茯苓菌株

购自广东省微生物菌种保藏中心。

2.2 培养基

2.2.1 PDA 培养基

马铃薯 200 g 煮汁过滤,葡萄糖 20 g,胰蛋白胨 2 g,酵母提取物 2 g,琼脂 10 g,加去离子水定容至 1 000 mL,pH 值自然。

2.2.2 PDB 液体培养基

马铃薯 200 g 煮汁过滤,葡萄糖 20 g,胰蛋白胨 2 g,酵母提取物 2 g,加去离子水定容至 1 000 mL,pH 值自然。

2.2.3 马铃薯液体再生培养基

马铃薯 200 g 煮汁过滤,葡萄糖 20 g,胰蛋白胨 1 g,酵母提取物 1 g,甘露醇 0.6 M,加去离子水定容至 1 000 mL。

2.2.4 马铃薯固体再生培养基

马铃薯 200 g 煮汁过滤,葡萄糖 20 g,胰蛋白胨 1 g,酵母提取物 1 g,甘露醇 0.6 M,琼脂 10 g,加去离子水定容至 1 000 mL。

2.2.5 麦芽糖液体再生培养基

麦芽糖 10 g,葡萄糖 4 g,酵母提取物 4 g,甘露醇 0.6 M,加去离子水定容至 1 000 mL。

2.2.6 麦芽糖固体再生培养基

麦芽糖 10 g,葡萄糖 4 g,酵母提取物 4 g,甘露醇 0.6 M,琼脂 10 g,加去离子水定容至 1 000 mL。

2.2.7 纤维二糖液体再生培养基

纤维二糖 15 g,胰蛋白胨 2 g,酵母提取物 4 g,甘露醇 0.6 M,加去离子水定容至 1 000 mL。

2.2.8 纤维二糖固体再生培养基

纤维二糖 15 g,胰蛋白胨 2 g,酵母提取物 4 g,甘露醇 0.6 M,琼脂 10 g,加去离子水定容至 1 000 mL。

2.3 试剂

溶壁酶(Lywallzym),购自广东微生物菌种研究所;崩溃酶(Driselase),购自美国 Sigma 公司。

0.6 M 甘露醇溶液:109.32 g 甘露醇,加去离子水定容至 1 000 mL。

3 实验方法

3.1 原生质体的制备

3.1.1 菌丝体培养

在 PDA 平板上,25 ℃ 下培养茯苓 GIM5.219 菌株 3—7 天,挑取 20—30 个小菌丝块于盛有 100 mL PDB 液体培养基的锥形瓶中,28 ℃,150 r/min 摇床震荡 60 h 后,用三层灭菌擦镜纸过滤收集菌丝体,再用 0.6 M 甘露醇溶液冲洗菌丝体至团状。

3.1.2 酶液配制

称取一定酶,加入试管中,再加入 5 mL 0.6 M 的无菌甘露醇充分溶解,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

3.1.3 原生质体的配制

称取上述菌丝体 0.5 g 于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 配制好的酶液,于 28—38 ℃,静置酶解 2—4 h。酶解后经脱脂棉过滤,用 0.6 M 甘露醇溶液反复冲洗,收集滤液,于 4 ℃,3 500 r/min 离心 20 min,弃上清,沉淀即为原生质体。

3.1.4 原生质体计数

用适量的 0.6 M 甘露醇溶液溶解原生质体,用血球计数板计数^[6]。

3.1.5 原生质体产率

每 g 菌丝体产生的原生质体数量,以原生质体个数/g 表示。

3.2 原生质体的制备的条件

3.2.1 菌丝菌龄

设置 5 个菌龄时间段:3 d,4 d,5 d,6 d,7 d。5 种处理在同一次实验中完成,以减少误差。除菌龄外,5 种处理的其他条件一致:用 3.5% 的溶壁酶加 1.0% 崩溃酶酶解,酶解温度 36 ℃,静置酶解 2.5 h。然后用血球计数板计数,分别计算原生质体产率。

3.2.2 酶种类及浓度

进行单一酶及不同浓度的溶壁酶(2%,2.5%,3.0%,3.5%,4.0%)与 1.0% 浓度的崩溃酶组合,共 7 组处理。每组酶液 5 mL,各加入 0.5 g 菌丝体,进行酶解,制备原生质体。7 种处理的其他条件一致:菌丝菌龄 6 d,酶解温度 36 ℃,静置酶解 2.5 h。然后用血球计数板计数,分别计算原生质体产率。

3.2.3 酶解时间

分别设定 5 个酶解时间:2 h,2.5 h,3 h,3.5 h,4

h。5 种处理的其他条件一致:用 3.5% 的溶壁酶加 1.0% 崩溃酶酶解,菌丝菌龄 6 d,酶解温度 36 ℃。然后用血球计数板计数,分别计算原生质体产率。

3.2.4 酶解温度

设置 6 个酶解温度:28 ℃,30 ℃,32 ℃,34 ℃,36 ℃,38 ℃。6 种处理的其他条件一致:用 3.5% 的溶壁酶加 1.0% 崩溃酶酶解,菌丝菌龄 6 d,静置酶解 2.5 h。然后用血球计数板计数,分别计算原生质体产率。

3.3 原生质体的再生

(1)原生质体沉淀中加入 3 mL 液体再生培养基,28 ℃ 静置培养 3 d。

(2)将培养物倒入培养皿中,加入固体再生培养基于 25 ℃ 培养 7 d。同时将原生质体用无菌水进行低渗处理作为原生质体再生对照,然后用同样的方法涂布于再生培养基上,25 ℃ 培养 7 d。

(3)统计每个平板上长出的菌落数,计算再生率。

再生率% = (再生培养基上长出的菌落数-低渗处理后再生培养基上长出的菌落数)/涂布原生质体数 × 100%^[7]

3.4 原生质体的再生条件

3.4.1 再生培养基的成分

分别用三种再生培养基对原生质体进行再生:马铃薯、麦芽糖及纤维二糖再生培养基。

3.4.2 原生质体涂布方法

单层涂布法:将培养物倒入培养皿中,加入约 10 mL 固体再生培养基混匀,于 25 ℃ 培养 7 d。双层涂布法^[8]:将培养物倒入培养皿中,加入约 10 mL 固体再生培养基混匀,冷却至 50 ℃ 左右,待其凝固后,上面再铺约 10 mL 固体再生培养基。统计长出的菌落数,计算再生率。

3.4.3 酶解时间

分别取 2 h,2.5 h,3 h,3.5 h,4 h 的原生质体,用双层涂布法进行再生实验。统计长出的菌落数,计算再生率。

4 结果与分析

4.1 原生质体制备条件的优化

4.1.1 菌丝菌龄

实验结果表明(见表 1),从培养第 3 d 开始,随

着茯苓菌丝菌龄的增大,原生质体的产率也逐渐增加,在第 6 d 的时候达到最大值 39.38×10^7 个/g(见图 1),随后产率开始下降。结果显示,菌丝菌龄对原生质体的制备有很明显的影响。对于菌龄过小的菌丝,菌丝细胞处于生长期,细胞壁比较薄弱,容易被酶解,而细胞膜不成熟不完善,导致原生质体不稳定,易产生破裂;对于菌龄过大的菌丝,菌丝细胞已进入稳定期或处于稳定后期,这时菌丝老化,细胞壁增厚,对酶的敏感性降低,导致酶解过程难以进行;而处于对数时期的菌丝细胞最有利于茯苓原生质体的释放,且原生质体的质量、活性都最佳^[9]。

表 1 菌丝菌龄对茯苓原生质体产率的影响

菌丝菌龄/d	3	4	5	6	7
原生质体产率/(10^7 个/g)	9.38	13.75	19.70	39.38	23.6

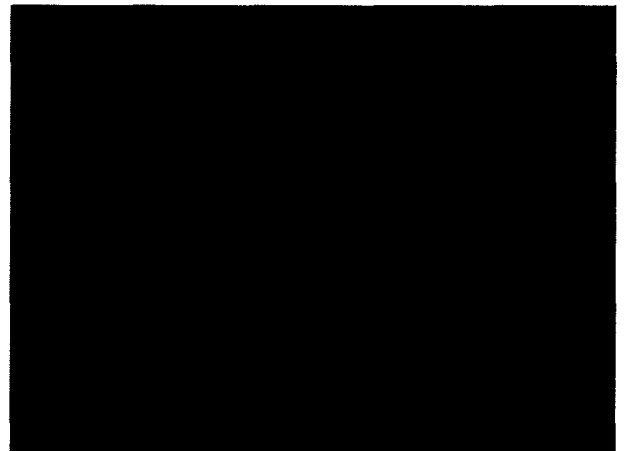


图 1 最优制备条件释放的原生质体

4.1.2 酶种类及浓度

实验结果表明(见表 2),使用 3.5% 溶壁酶 + 1.0% 的崩溃酶时,酶解效果最佳,获得茯苓原生质体的量最高。真菌细胞壁的成分非常复杂,使用混合酶进行酶解比单一酶的效果更佳。本实验所用的溶壁酶为混合酶类,本身效果不差,加入其他酶类酶解效果更好。当酶浓度达到一定时,处于饱和状态,不再释放原生质体;当酶浓度过高时,酶当中一般含有一些对原生质体有害的酶类,酶量增加时,杂酶的浓度也会变高,影响原生质体的活性,并且还会使原生质体过度酶解而变形。

表2 酶种类及浓度对茯苓原生质体产率的影响

酶条件	2%l	2%d	2%l+1%d	2.5%l+1%d	3%l+1%d	3.5%l+1%d	4%l+1%d
原生质体产率 (10^7 个/g)	0.083	0.925	1.250	1.875	11.875	39.375	35.000

注:l代表溶壁酶;d代表崩溃酶。

4.1.3 酶解时间

实验结果表明(见图2),在酶解前期,随着处理时间的延长,所产生的原生质体的量也随之增加。在2.5 h达到最大值为 39.38×10^7 个/g,随后其值开始下降,但在3 h时,下降的不明显。茯苓菌丝在2.5—3 h之间已得到充分的酶解,原生质体释放完全。时间过短,会导致脱壁不全;过长酶解会造成原生质体破裂或者溶解,使原生质体的数目减少^[10]。

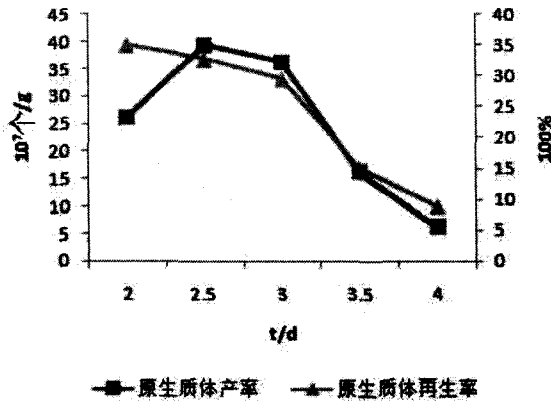


图2 酶解时间对茯苓原生质体产率和再生影响

4.1.4 酶解温度

实验结果表明(见表3),在酶解前期,随着酶解温度上升,原生质体的得率也不断增加,当酶解温度达到 $36\text{ }^\circ\text{C}$ 时,产量最大,为 39.38×10^7 个/g。随后原生质体的产量开始下降。实验使用混合酶类,不同的酶活性最强时的温度也有所不同^[11]。

表3 酶解温度对茯苓原生质体产率的影响

酶解温度/ $^\circ\text{C}$	28	30	32	34	36	38
原生质体产率 (10^7 个/g)	9.38	25.0	25.0	26.25	39.38	11.25

4.2 原生质体的再生条件

4.2.1 再生培养基的成分

实验结果表明,三种不同的培养基对茯苓原生质体的再生能力几乎没有差异。

4.2.2 原生质体涂布方法

实验结果发现,单层涂布与双层涂布所得的茯

苓原生质体的再生率有着相当大的差异。用双层涂布法的效果较好,再生率可达到32.7%;而单层涂布只有11.3%。

4.2.3 酶解时间

实验结果显示(见图1),随着酶解时间的延长,原生质体再生率也不断下降。而在3 h之前,下降的幅度较小;超过3 h之后,开始大幅度的下降。原生质体需要一定的活性才能再生,酶解3 h之后,原生质体受到的伤害大幅度增加,活性也大幅度的降低,因此难以再生。

5 讨论

酶解法制备原生质体是最普遍的一种方法。本研究从8个方面探讨了原生质体的制备与再生,得出结论:采用培养6 d的茯苓菌丝,在3.5%溶壁酶+1%崩溃酶的混合酶液中, $36\text{ }^\circ\text{C}$ 酶解2.5—3 h,获得的原生质体产量最高,可达到 39.38×10^7 个/g,双层涂布再生率可达32.7%。

程水明等从酶解温度、酶液浓度、酶解pH、酶解时间4个条件研究茯苓原生质体的最佳制备,以5—7天菌丝为材料,0.6 M甘露醇作为渗透压稳定剂,pH5.5—6.0,在2%酶液的作用下, $41\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴酶解3 h,可得到 1.7×10^4 个/g的原生质体^[12]。笔者所做的与其相比酶解采用混合酶,产量大大得以提高。梁清乐等从最适菌龄、酶液浓度、酶解时间、稳定剂4个方面对茯苓原生质体制备与再生进行了探究,得到结果以56—72 h菌丝为材料,0.6 M甘露醇作为渗透压稳定剂,在3%溶壁酶+3%蜗牛酶的作用下, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 震荡酶解2.0—2.5 h,最高可得到 6.5×10^5 个/g的原生质体^[13]。与之相比,笔者研究pH对原生质体制备的影响,酶的应用也有所改变,也大大提高了茯苓原生质体的产量。王伟霞等^[14-15]也对茯苓原生质体的制备进行了探究,但其产量和再生率都不及笔者的研究结果。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S],

- 2010;46.
- [2] 章佩芬,罗焕敏. 飞杨草药理作用研究概况[J]. 中药材,2005,28(5):437-438.
- [3] 蔡丹凤,陈美元,郭仲杰,等. 茯苓菌株生物学特性的研究[J]. 中国食用菌,2009,28(1):23-26.
- [4] 刘祖同,罗信昌. 食用菌生物技术及应用[M]. 北京:清华大学出版社,1999:86-124.
- [5] 邱龙新. 食用菌原生质体技术研究现状. 龙岩师专学报[J],2002,20(6):49-51.
- [6] 朱坚,张鹏等. 白灵菇原生质体制备条件的优化[J]. 中国农学通报,2011,27(25).
- [7] 陈亮,孙庚午,王洪凯,等. 葡萄座腔菌原生质体的制备及 *gfp* 的转化[J]. 林业科学,2014(6).
- [8] 王杰,林俊芳,云慧,等. 草菇原生质体制备、再生及转化研究[J]. 华南农业大学学报,2007,28(3).
- [9] WAN Y, ZHANG D J, HUANG Y, et al. Establishment of protoplast transformation system in *Alternaria tenuissima* using G418 selection marker[J]. Agricultural Science & Technology, 2008,9(3):59-62.
- [10] 杨迎青,李明海,杨媚,等. 水稻纹枯病菌原生质体制备与再生条件的优化[J]. 华中农业大学学报,2010,29(5).
- [11] DE-BEKKER C, WIEBENGA A, AGUILAR G, et al. An enzyme cocktail for efficient protoplast formation in *Aspergillus niger*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009,76(3):305-306.
- [12] 程水明,周导华. 茯苓菌丝原生质体最佳条件研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(18):4651-4666.
- [13] 梁清乐,王秋颖,曾念开,等. 茯苓灭活原生质体融合育种研究[J]. 中草药,2006,37(5).
- [14] 王伟霞,李福后. 茯苓原生质体制备与再生条件的研究[J]. 菌物研究,2006,4(4).
- [15] 吕龙,郭成金. 正交设计法探讨茯苓原生质体的最佳制备条件[J]. 天津师范大学学报,2007,27(3).