

影响菌根真菌黑核菌原生质体 分离的因子研究*

孔繁翔

摘要 从菌根真菌黑核菌(*Cenococcum geophilum*)菌丝分离出原生质体,并获得再生菌落。研究了预处理方法及不同水解酶组合,酶解温度和菌丝密度对原生质体产率的影响。在用胰蛋白酶($20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)预处理后,以0.8 M山梨醇为渗透压稳定剂,温度为20 C, pH5.5及纤维素酶,溶解酶和浸解酶处理,可获得较高的原生质体产量。在固体及液体再生培养基中,原生质体均可形成再生菌落,再生率为1%~5%。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和甘露醇脱氢酶活性测定结果表明,分离出的原生质体具有较高的生理活性。

关键词 黑核菌、菌根真菌、原生质体再生、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、甘露醇脱氢酶

从菌根真菌获得的原生质体可以用于真菌的转化、诱导突变和细胞融合实验,以改良真菌品种;同时,原生质体又是分离细胞器,如线粒体和液泡的重要来源,是进行亚细胞生理学和细胞膜物质转移性研究的理想工具,而这种研究在探索菌根真菌与植物之间的营养关系方面,具有很重要的意义。

自Kropp和Fortin^[1]首次报道从菌根真菌分离出原生质体以来,已有多种菌根真菌获得原生质体并形成再生菌落^[2]。粘滑菇属(*Hebeloma*)的3个种及乳牛肝菌[*Suillus bellin*(Pers.) Cocher and Couch]的原生质体,已被用作筛选突变种的工具^[3];有报道以一种与挪威云杉(*Picea abies* Karst.)形成菌根的担子菌哈蟆菌[*Amanita muscaria*(L. ex Fr.) Pers. ex Hook.]的原生质体为材料,用来研究碳水化合物透过其质膜的特性^[4]。

本文报道了不同水解酶的组合,温度和菌丝在分离液中的密度等有关因子对菌根真菌——黑核菌的原生质体产率及其再生菌落形成的影响,并测定和比较了菌丝与原生质体所含代谢酶的活性,以确定原生质体的生理功能,为分离其中的功能细胞器,从亚细胞水平进一步研究菌根真菌与植物之间营养物质交换的机理,建立一个较理想的系统。

1 材料与方 法

1.1 菌种和培养方法

黑核菌(*Cenococcum geophilum* Fr.)由德国图宾根大学植物生理生态研究所提供,从野外林地挪威云杉的外生菌根分离得到。菌丝培养在装有100 mL MMNC培养基^[5]的锥形瓶(250 mL)中,置于摇床上,20 C,黑暗,连续振荡(90 rpm)。培养期间2 d转接一次。转接前,菌丝培

1994-06-29 收稿。

孔繁翔副教授(南京大学环境科学与工程系 南京 210093)。

* 本文为1993~1994年中德合作交流资助项目,1995年国家自然科学基金项目“酸沉降对菌根共生蛋白合成及营养关系的影响研究”部分内容。

养物用匀浆器(Ultra-Turrax, 9 400 rpm, 1 min)将菌丝打散,吸取 5 mL 已匀浆的菌丝悬浮物,加入新鲜培养基,保持菌落在液体培养基中,其直径小于 3 mm。

1.2 菌丝的预处理

培养 1~2 d 的菌丝用孔径为 40 μm 的尼龙丝绢收集,重蒸水洗涤 3 次,重新悬浮于 MMNC 液体培养基中(在高压灭菌前将其 pH 用 0.25 M KOH 调至 7.1),每 100 mL 菌丝悬浮液加入胰蛋白酶 2.0 mg,并置于黑暗中进行预处理。

1.3 原生质体的分离

1 h 后,经预处理的菌丝用丝绢收集,并相继用重蒸水和原生质体分离液洗涤,分离液的组成为:0.8 M 山梨醇,0.5%牛血清蛋白,0.2%抗坏血酸,1 mM 氯化钙和 5 mM KOH-Mes 缓冲液,pH5.5,洗后的菌丝悬浮于分离液中,加入各种水解酶,在黑暗中保温 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

(1)不同水解酶组合对原生质体的释放影响:试验的酶有几丁质酶,纤维素酶,溶解酶和浸解酶等。所试酶在溶解于分离液后,离心(3 000 g, 10 min),经 0.2 μm 微孔滤膜过滤灭菌。各种水解酶的浓度见结果。

(2)不同菌丝密度对原生质体的分离影响:在每毫升分离液中,加入菌丝鲜重分别为 20、40、60、80 mg,水解酶组合为纤维素酶(10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),溶解酶(2.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和浸解酶(5.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

(3)酶解温度对原生质体产率的影响:所用水解酶组合同(2),在水解酶加入后,菌丝处理温度分别为 8~36 $^{\circ}\text{C}$ 。

酶处理 3 h 后,用一层 40 μm 和三层 20 μm 的尼龙丝绢过滤,收集原生质体,并用分离液离心洗涤 3 次,原生质体再次悬浮于分离液中,用血球计数板检测悬浮液中原生质体产率后,分成二等份,一部分用于再生试验,另一部分用山梨醇-缓冲液(0.8 M 山梨醇溶解于 25 mM Tris /Mes 缓冲液中,pH6.8)离心洗涤 3 次后,测定其蛋白质含量及酶活性。

1.4 原生质体的再生

0.4 mL 原生质体悬浮液涂布于 2%琼脂的 MMNC 固体培养基表面,并以 0.8 M 山梨醇(MMNSO)或 0.8 M 氯化钾(MMKNCl)作为渗透稳定剂,培养皿(直径为 9 cm)置于黑暗中,20 $^{\circ}\text{C}$ 。在倒置显微镜下连续观察原生质体的再生过程,10 d 左右,直到可见菌落出现,计数菌落数,对照为原生质体先悬浮于未加渗透稳定剂的 MMNC 液体培养基中,再涂布于固体再生培养基上。原生质体的再生率按 Kumari 等^[6]方法计算。

1.5 酶活性和蛋白质含量的测定

菌丝和原生质体用液氮迅速冷冻固定,并储存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 下,菌丝在冷冻条件下,用微型研磨器(Micro-dismembrator, 德国)破碎,所得菌丝粉末在-30 $^{\circ}\text{C}$ 下真空冷冻干燥,并在真空条件下保存。菌丝粉末和原生质体用 Tris/硼酸盐缓冲液(0.1 M/0.3 M, 7 mM 巯基乙醇, 5 mM EDTA, pH7.5)在 0 $^{\circ}\text{C}$ 下提取,离心(10 000 g, 10 min),上清液用于酶活性及蛋白质含量的测定。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性在微孔板上按 John 方法^[7]测定;甘露醇脱氢酶的测定按 Walter 方法^[8]测定;蛋白质含量的测定按 Guttenberger 和 Hampp 方法^[9]进行,以牛血清蛋白(BSA)作标准蛋白。



果与已有的丝状菌丝原生质体分离研究报道基本一致^[10,11]。当菌丝密度高于 $100 \text{ mg 鲜重} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,原生质体产量有所下降,这可能是由于相应的水解酶浓度有限的原因。

本实验中,胰蛋白酶对菌丝的预处理对原生质体释放有着很重要的作用,若无此预处理,直接加入水解酶,则很难观察到原生质体的形成。

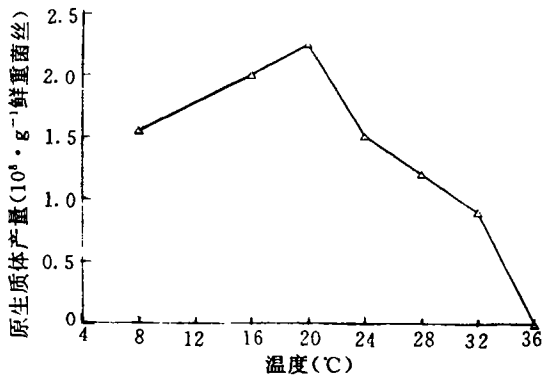


图3 温度对原生质体形成的影响

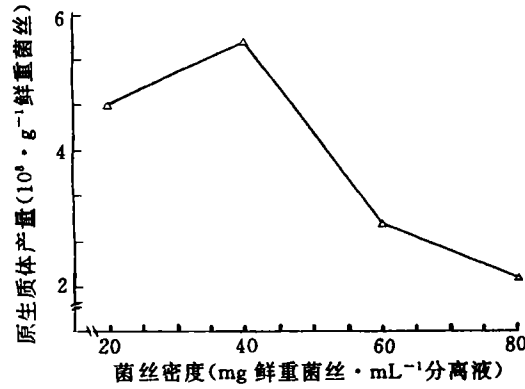


图4 菌丝密度对原生质体产率的影响

2.2 原生质体的再生

当原生质体悬浮液涂布于 MMNC 再生固体培养基上 10 h 后,原生质体开始再生,合成新的细胞壁,并逐渐形成菌丝。

对原生质体再生过程的观察表明,在原生质体形成菌丝时,有两种形态发生过程。一种是当涂布于固体培养基后,数个原生质体聚集在一起,10~15 h 后,向各个方向形成正常的菌丝(图 1b);另一种是,一个原生质体反复分裂及体积增大几倍,然后在一个或几个方向伸出发芽管,并发展为正常的菌丝(图 1c)。8~10 d 后,平板上出现可见菌落(图 1d)。

再生菌落的直径与固体培养基中的渗透压稳定剂种类有关。当以 0.8 M KCl 为稳定剂时,10 d 后,菌落的直径($0.3 \sim 0.8 \text{ mm}$)要比在用山梨醇作稳定剂中的菌落($0.5 \sim 2.3 \text{ mm}$)小得多。

原生质体在固体再生培养基中的再生率为 $1.3\% \sim 4.8\%$ 左右。

在液体再生培养基中,虽然原生质体也能够再生,形成菌落,但其再生率仅为在固体培养基中的 10% 。这可能是在液体培养基中,由于液体的流动,导致在细胞质膜外围所合成的细胞壁成份流失的可能性增加所造成的。

2.3 酶活性及蛋白质含量测定

菌丝及原生质体的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,甘露醇脱氢酶和蛋白质含量测定结果见表 1。与菌丝相比较,分离的原生质体仍具有较高的生理活性,而两种酶的活性以单位蛋白质的活性表示时,在原生质体中高于菌丝中的酶活性,这可能是由于原生质体无细胞壁蛋白质的原因(即相似水平的酶活性与较少蛋白质含量之比)。

表 1 菌丝及原生质体中酶活性和蛋白质含量测定^①

材料	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	甘露醇脱氢酶	蛋白质含量
	(mU · mg ⁻¹ protein)		
菌 丝	63.4 ± 4.4	20.5 ± 0.8	0.058 ± 0.004 ^②
原生质体	69.2 ± 7.2	29.94 ± 0.9	0.003 ± 0.0006 ^③

①测定数据 ± SD (n=9), ②mg · g⁻¹ 干重菌丝, ③mg · 10⁻⁶ 原生质体。

3 讨 论

本实验所用的方法对菌根真菌黑核菌原生质体的分离是十分有效的,而菌丝培养前的高速匀浆及胰蛋白酶的预处理是本研究的两个特点。匀浆后,菌丝充分散开,聚集程度降到最小,因此,使得菌丝细胞壁更充分地暴露于水解酶的作用之下。但是,一般丝状真菌常常又很易在高速及长时间匀浆后失去活力,只有黑核菌可以经受本实验中所采用的高速和长时间的匀浆后,仍保持原有的活性^[2];胰蛋白酶可以水解菌丝细胞壁外围的附着蛋白,使细胞壁有更多的与水解酶接触的机会,所以胰蛋白酶起着与高速匀浆同样的作用,Elorza^[12]等在其研究中也获得类似的结论,他在用 DTT 和 EDTA 与蛋白酶共同作用,提高了原生质体的产量,并认为,蛋白酶的存在是分离此类真菌菌丝原生质体的关键。因此,很明显,在本研究中,只有当在胰蛋白酶除去不定形的蛋白之后,水解酶才能发挥作用,降解菌丝细胞壁成份。考虑到水解酶的作用结果,可以推测,蛋白质和几丁质是黑核菌细胞壁的重要结构成分。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和甘露醇脱氢酶是依赖于 NADP 的酶,这两个酶的存在表明,在黑核菌中,有可能是通过戊糖磷酸途径为果糖还原成甘露醇提供 NADPH 的^[7,8],很明显,在所分离出的原生质体中仍保持了与菌丝中相似的代谢特性。因此,用本实验方法得到的黑核菌原生质体,有可能成为研究菌根真菌生物化学特性以及与宿主植物之间营养关系的理想工具。

参 考 文 献

- 1 Kropp B R, Fortin J A. Formation and regeneration of protoplast form ectomycorrhizal basidiomycetae *Laccaria bicolor*. Can. J. Bot. ,1986,64(4):1224~1226.
- 2 Victoria B, Paul A L, Dixon R K. Protoplast formation from selected species of ectomycorrhizal fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. ,1989,30(1):381~387.
- 3 Hebraud M, Fevre M. Protoplast production and regeneration from mycorrhizal fungi and their use for isolation of mutants. Can. J. Microbiol. ,1987,34(1):157~161.
- 4 Chen X Y, Hampp R. Sugar uptake by protoplasts of the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. New Phytologist, 1993,125(2):601~608.
- 5 Guttenberger M, Hampp R. Ectomycorrhizins-symbiosis-specific or artifactual polypeptides from ectomycorrhizas? Planta, 1992,188(1):129~136.
- 6 Kumari J A, Madras T P. Improved technique on reversion of mycelial protoplast of *Trichoderma reesei* into mycelia. Bioprocess Engineering, 1993,8(1):287~294.
- 7 John B W H. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Agaricus bisporus*: Purification and properties. J. G. Microbiology, 1985,131(1):321~328.
- 8 Walter G, Niehaus J R, Roger P, et al. Purification and characterization of mannitol dehydrogenase from *Aspergillus parasiticus*. J. Bacteriol. ,1982,151(1):243~250.
- 9 Guttenberger M, Hampp R. A dot-blot assay for quantitation of nanogram amounts of protein in the presence of carrier ampholytes and other possibly interfering substances. Anal. Biochem. ,1991,196(1):99~103.
- 10 Peberdy J F, Buckley C E, Diana C D, et al. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. ,1976,67(1):23~26.
- 11 Lynch P T, Collin H A, Susan I. Isolation and regeneration of protoplast from *Fusarium tricinctum* and *F. oxysporum*. Trans. Br. Mycol. Soc. ,1985,85(1):135~140.
- 12 Elorza M V, Hortensia R, Gozalbo D, et al. Cell wall composition and protoplast regeneration in *Candida albicans*. Antonie van Leeuwenhoek, 1983,49(1):457~469.

Study on the Factors Affecting Protoplast Release in Mycorrhizal Fungus *Cenococcum geophilum*

Kong Fanxiang

Abstract Protoplasts were isolated from the mycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. To obtain high yield of protoplast, it was very effective to pretreat the mycelium with trypsin ($20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for 1 h) and then incubated the mycelium in the mixture containing the lytic enzymes with 0.8 M sorbitol as the osmotic stabilizer. The effects of different combination of lytic enzymes, density of mycelium in incubation and incubation temperature on the yield of protoplast were investigated. In MMNSO and MMNKCI solid (2% agar) or liquid medium, the protoplasts were regenerated and reversed into normal hyphae. Regeneration rate of protoplast was about 1%~5%. Test of specific activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and mannitol dehydrogenase indicated that there was a similar activity in protoplast as compared with that in mycelium.

Key words *Cenococcum geophilum*, mycorrhizal fungus, protoplast regeneration, G6PDH, MTLDH