

灵芝原生质体的制备与再生研究

王 昱, 王 义, 王 康宇, 叶 鹏飞, 孙 春玉, 张 美萍

(吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:以泰山灵芝为试材,研究了菌龄、酶浓度、酶解时间、酶解温度、酶解 pH、渗透压稳定剂对灵芝原生质体制备和再生的影响。结果表明:菌龄为 7 d,以甘露醇为渗透压稳定剂,采用酶浓度 2.0% 的溶壁酶, pH 为 6.0, 31℃ 条件下酶解 2.5 h 为灵芝原生质体制备的最适条件;并在原生质体再生固体培养基(以 0.6 mol/L 蔗糖为渗透压稳定剂)上,原生质体的再生率最高。

关键词:灵芝;原生质体;制备;再生

中图分类号:S 567.3⁺1 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2013)16-0184-05

灵芝作为拥有数千年药用历史的中国传统珍贵药材被誉为“仙草”、“百草之王”,具有很高的药用价值和食用价值。目前已知灵芝属有 100 多种,灵芝含有有机锗、高分子多糖、灵芝酸及腺嘌呤核苷等生物活性成分^[1]。现代医学通过大量的药理和临床试验已经证明,灵芝对多种疾病,尤其是癌症、心脏病、脑血栓等严重威胁人类生命的疾病具有十分显著的疗效^[2]。高等担子菌原生质体的研究,始于 1972 年对裂褶菌原生质体的分离^[3]。近 10 a 来对于灵芝原生质体的分离已有报道,这为以原生质体为媒介的生物技术试验提供了理论依据。现以泰山灵芝为试材,研究了菌龄、酶浓度、酶解时间、酶解温度、酶解 pH、渗透压稳定剂对灵芝原生质体制备和再生的影响,以期后续灵芝原生质体的融合和基因工程

研究等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

泰山灵芝(*Ganoderma lucidum*)菌株购自吉林农业大学菌物研究所,菌种保藏在 PDA 斜面培养基上,培养温度 28℃,保藏温度 4℃。培养基:斜面培养基 PDA:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、KH₂PO₄ 3 g、MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g、VB₁ 500 mg、琼脂 15 g。菌丝生长液体培养基 PDA:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、KH₂PO₄ 3 g、MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g、VB₁ 500 mg。原生质体再生固体培养基 MYG:葡萄糖 4 g、麦芽糖 10 g、酵母粉 4 g、琼脂粉 15 g。酶制剂:溶壁酶购自上海源叶生物科技有限公司,使用时溶于 0.6 mol/L 渗透压稳定剂甘露醇中,调节 pH 值,并由高压灭菌的 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌,现用现制以保证酶活。渗透压稳定剂:0.6 mol/L 甘露醇,0.6 mol/L 蔗糖,0.6 mol/L 葡萄糖,0.6 mol/L KCl,0.6 mol/L MgSO₄。

1.2 试验方法

1.2.1 灵芝菌丝的液体培养条件

取 PDA 斜面上生长

第一作者简介:王昱(1987-),女,硕士研究生,研究方向为植物细胞工程。E-mail:247989080@qq.com。

责任作者:张美萍(1966-),女,博士,教授,研究方向为药用植物细胞工程。E-mail:wzhaoyun@tom.com。

收稿日期:2013-04-24

Comparison of Leaf Anatomy Structure of 10 Species of *Lycium* Linn.

FAN Yun-fang, SHI Zhi-gang, WANG Ya-jun, ZHAO Jian-hua, AN Wei
(National Wolfberry Engineering Research Center, Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract: Using routine paraffin sectioning method, the leaf anatomy structures in different parts of 10 species of *Lycium* Linn. were compared through microscope. The results showed that the majority of the leaves in *Lycium* Linn. were strip; there was diversity among species in *Lycium* Linn. about the differentiation between palisade tissue and spongy tissue in mesophyll, mainly focused on the layers of palisade tissue and thickness of spongy tissue. The shape of midrib and quantity of crystal cell in it also had diversity among species in *Lycium* Linn.

Key words: *Lycium* Linn.; leaf; anatomy structure; comparison

旺盛的菌丝,接种于液体 PDA 培养基中,28℃ 黑暗静止培养。

1.2.2 原生质体分离 取液体培养基中细碎菌丝体于 50 mL 刻度离心管中,5 000 r/min 离心 10 min 弃上清,收集菌丝体,分别用无菌水和甘露醇冲洗菌丝 2 次,5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,将得到的菌丝体称重,每 1.0 mL 酶液加入 1.0 g 菌丝,置于 110 r/min,31℃ 摇床中酶解。酶解结束后,用脱脂棉过滤菌液,以除去残留菌丝体,得到的滤液 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清,得到的原生质体溶于 0.6 mol/mL 的甘露醇中。

1.2.3 菌龄对原生质体产率的影响 取培养时间为 4~8 d 菌丝体,31℃ 下酶解 2.5 h,酶液 pH 5.5,渗透压稳定剂为 0.6 mol/L 甘露醇,菌龄设定为:4、5、6、7、8 d。

1.2.4 溶壁酶浓度对原生质体产率的影响 取培养 5 d 的菌丝体,31℃ 下酶解 2.5 h,渗透压稳定剂为 0.6 mol/L 甘露醇,选取酶浓度为 1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5% 的溶壁酶。

1.2.5 酶解 pH 值对原生质体产率的影响 取培养 5 d 菌丝体,31℃ 下酶解 2.5 h,渗透压稳定剂为 0.6 mol/L 甘露醇,酶解 pH 设定为:4.5、5.0、5.5、6.0、6.5。

1.2.6 酶解时间对原生质体产率的影响 取培养 5 d 的菌丝体,酶解温度 31℃,pH 5.5,选渗透压稳定剂为 0.6 mol/L 甘露醇,酶解时间设定为:1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h。

1.2.7 酶解温度对原生质体产率的影响 取培养 5 d 的菌丝体,酶解 2.5 h,酶液 pH 5.5,渗透压稳定剂为 0.6 mol/L 甘露醇,酶解温度设定为:25、28、31、34、37℃。

1.2.8 渗透压对原生质体产率的影响 取培养 5 d 的菌丝体,31℃ 下酶解 2.5 h,pH 5,选取的渗透压稳定剂分别为:0.6 mol/L 甘露醇、0.6 mol/L 蔗糖、0.6 mol/L

葡萄糖、0.6 mol/L $MgSO_4$ 、0.6 mol/L KCl。

1.2.9 渗透压对原生质体再生的影响 分别采用 0.6 mol/L 甘露醇、0.6 mol/L 蔗糖、0.6 mol/L 葡萄糖、0.6 mol/L KCl、0.6 mol/L $MgSO_4$ 作为稳定剂加入到灵芝 MYG 再生培养基中,将制备好的原生质体稀释成 1×10^5 mol/L,取 0.1 mL 原生质体悬液涂皿,28℃ 培养 6~8 d,观察平皿中的再生菌落数,计算再生率。

1.3 数据分析

涂布好的平皿置于 28℃ 培养箱中黑暗培养,8~10 d 后计算菌落数目。再生率的计算:培养 10 d 后,计算菌落数。原生质体再生率(%)=(原生质体实际再生菌落数-对照组再生菌落)/加入原生质体数 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 菌丝体的培养

试验发现,在菌丝体培养的过程中,静置培养优于振荡培养,可以获得大量的松散状菌丝体,振荡培养会形成菌丝球,而在酶解时,菌丝球内部不易与溶壁酶接触,因而很难得到理想的原生质体。而静置培养菌丝以辐射方式生长,不成球,有利于溶壁酶的酶解。

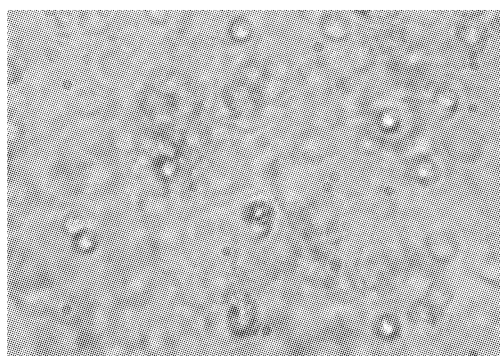
2.2 菌龄对原生质体产率的影响

菌龄是获得大量原生质体非常重要的因素。从表 1 和图 1 可以看出,在第 4~6 天,原生质体产率随着时间的递增而递增,在第 7 天时达到最高,为 4.12×10^5 mol/L,第 8 天有所下降,并稍低于第 6 天产的量。

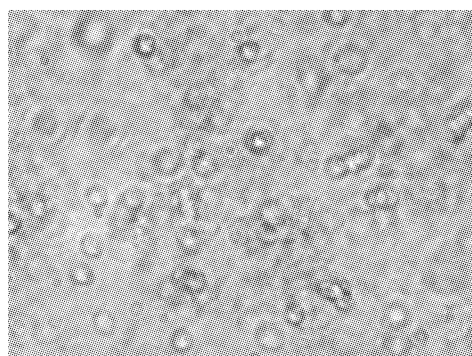
表 1 菌龄对原生质体产率的影响

Table 1 Effects of fungus age on productivity of *Ganoderma lucidum* protoplast

菌龄/d	4	5	6	7	8
原生质体数量 / $\times 10^5$ mol \cdot L $^{-1}$	1.23	2.21	2.49	4.12	2.24



菌龄4 d



菌龄7 d

图 1 菌龄对原生质体产率的影响

Fig. 1 Effects of fungus age on productivity of *Ganoderma lucidum* protoplast

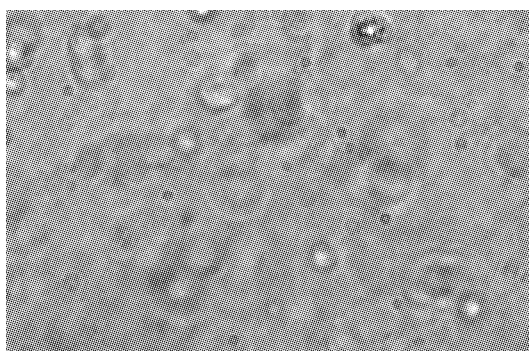
2.3 溶壁酶浓度对原生质体产率的影响

由表 2 可知,尽管原生质体的制备需在一定浓度的酶溶液中进行,但原生质体产量并非与酶浓度成正比,浓度为 2.0% 的溶壁酶效果最好,在相同的酶解时间内能获得最多的原生质体,为 4.12×10^5 mol/L,随着酶浓度的增加,原生质体的产量反而下降,而酶浓度过低,酶解效果亦不理想。

表 2 溶壁酶浓度对原生质体产率的影响

Table 2 Effects of lywallzyme concentration on productivity of *Ganoderma lucidum* protoplast

溶壁酶浓度/%	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
原生质体数量 / $\times 10^5$ mol \cdot L $^{-1}$	2.02	4.12	3.78	3.22	2.05



1.5%

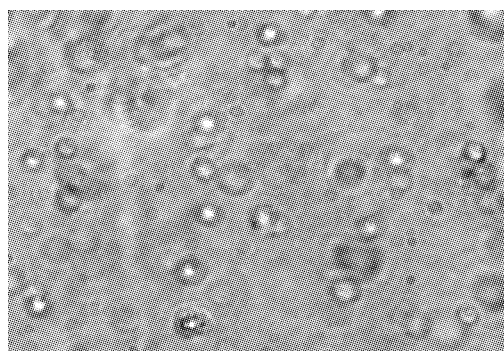
2.4 酶解 pH 值对原生质体产率的影响

pH 值是原生质体制备时影响酶活力的一个重要因素,适合的 pH 值对获得大量原生质体有很大帮助。由表 3 可知,pH 值为 6.0 时酶解效果最好,得到的原生质体数量也最多,为 2.55×10^5 mol/L。

表 3 酶解 pH 值对原生质体产率的影响

Table 3 Effects of pH value on productivity of *Ganoderma lucidum* protoplast

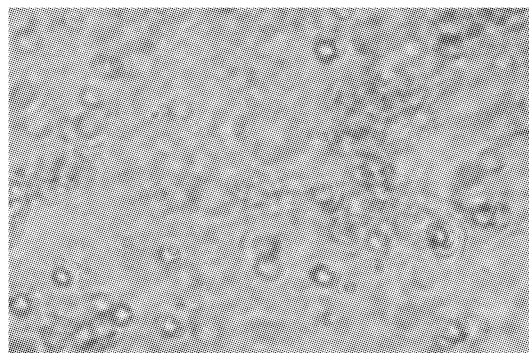
酶解 pH 值	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5
原生质体数量 / $\times 10^5$ mol \cdot L $^{-1}$	1.22	1.87	2.01	2.55	1.91



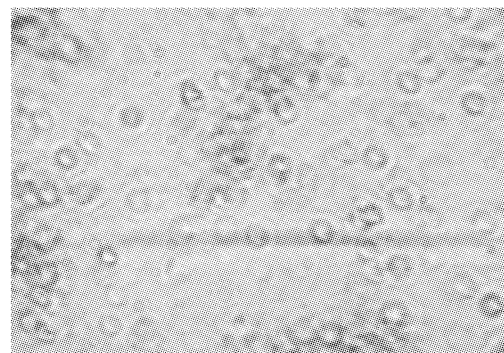
2.0%

图 2 溶壁酶浓度对原生质体的产率的影响

Fig. 2 Effects of lywallzyme concentration on productivity of *Ganoderma lucidum* protoplast



pH 4.5



pH 6.0

图 3 酶解 pH 值对原生质体的产率的影响

Fig. 3 Effects of pH values on productivity of *Ganoderma lucidum* protoplast

2.5 酶解时间对原生质体产率的影响

灵芝菌丝在酶解 1.5 h 以后,每 30 min 取样检测 1 次,直到酶解 3.5 h,检测原生质体数量。由表 4 可知,酶解 1.5~2.0 h 只有少量原生质体释放,酶解 2.0 h 之后,原生质体缓慢释放,数量逐渐增加,酶解 2.5 h 原生质体数量达到最大值,为 4.01×10^5 mol/L,随着酶解时间的增加,原生质体的数量不再增加。

表 4 酶解时间对原生质体产率的影响

Table 4 Effects of time on productivity of *Ganoderma lucidum* protoplast

酶解时间/h	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
原生质体数量 / $\times 10^5$ mol \cdot L $^{-1}$	1.56	2.22	4.01	3.56	3.12

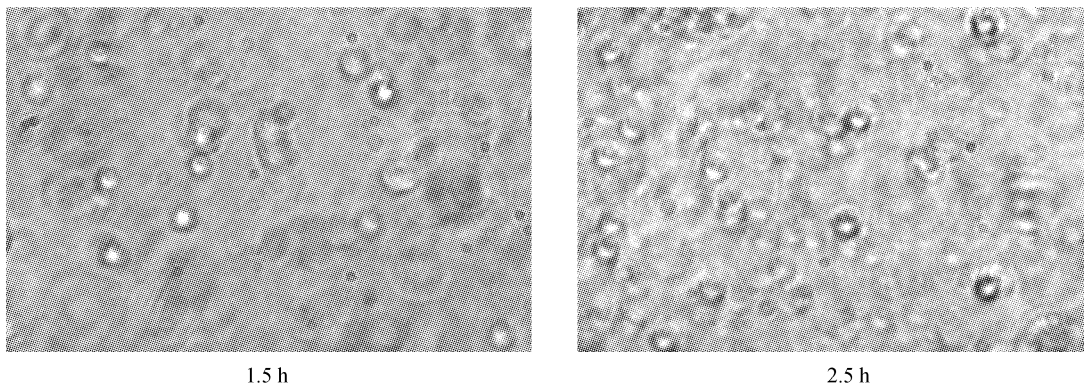


图 4 酶解时间对原生质体的产率的影响
Fig. 4 Effects of time on productivity of *Ganoderma lucidum* protoplast

2.6 酶解温度对原生质体产率的影响

酶解温度是影响酶活力的一个重要因素,温度过高或过低都不利于细胞壁的酶解。由表 5 可知,31℃条件下酶解效果最好,原生质体产率最高,为 $3.28 \times 10^5 \text{ mol/L}$,28℃稍次,随着温度的升高,酶活力下降,酶解效率亦随之下降。

表 5 酶解温度对原生质体产率的影响

Table 5	Effects of temperature on productivity of <i>Ganoderma lucidum</i> protoplast				
酶解温度/℃	25	28	31	34	37
原生质体数量 / $\times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.92	2.91	3.28	2.29	1.56

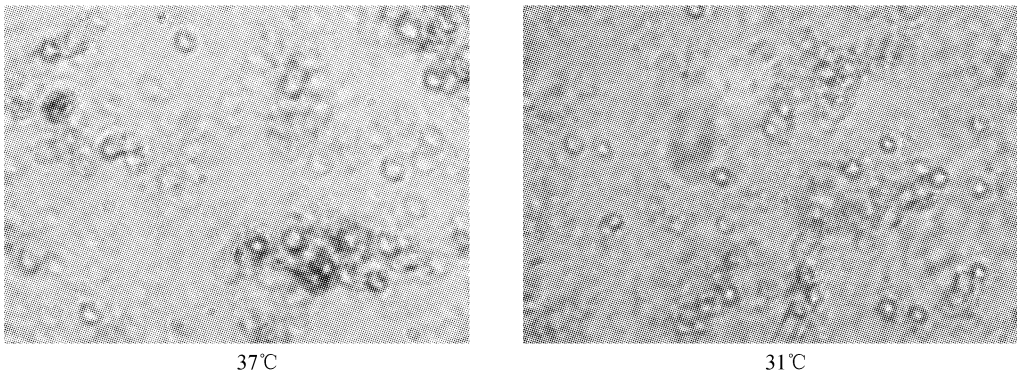


图 5 酶解温度对原生质体的产率的影响
Fig. 5 Effects of temperature on productivity of *Ganoderma lucidum* protoplast

2.7 渗透压稳定剂对原生质体产率的影响

渗透压稳定剂作为溶解溶壁酶的溶液,同时也是原生质体制备的液体环境,对原生质体的形成和保存有着至关重要的影响。结果表明,0.6 mol/L 的甘露醇作用效果最好,原生质体产率最高,为 $3.52 \times 10^5 \text{ mol/L}$,其次为蔗糖、葡萄糖,而无机盐 MgSO_4 、 KCl 效果较差。

2.8 再生培养基中不同渗透压稳定剂对原生质体再生的影响

由表 7 可知,0.6 mol/L 蔗糖作为渗透压稳定剂时,原生质体的再生率最高,为 $2.5 \times 10^{-4} \%$ 。

表 6 渗透压稳定剂对原生质体产率的影响

Table 6	Effects of osmotic pressure stabilizer on productivity of <i>Ganoderma lucidum</i> protoplast				
渗透压稳定剂 / $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	甘露醇	葡萄糖	蔗糖	KCl	MgSO_4
原生质体产率/%	3.52	2.88	2.95	1.02	1.59

表 7 再生培养基中不同渗透压稳定剂对原生质体再生率的影响

Table 7	Effects of osmotic pressure stabilizer on regeneration of <i>Ganoderma lucidum</i> protoplast in regeneration medium				
再生培养基 / $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	甘露醇	蔗糖	葡萄糖	KCl	MgSO_4
原生质体再生率/%	1.8×10^{-4}	2.5×10^{-4}	1.6×10^{-4}	0.9×10^{-4}	1.1×10^{-4}

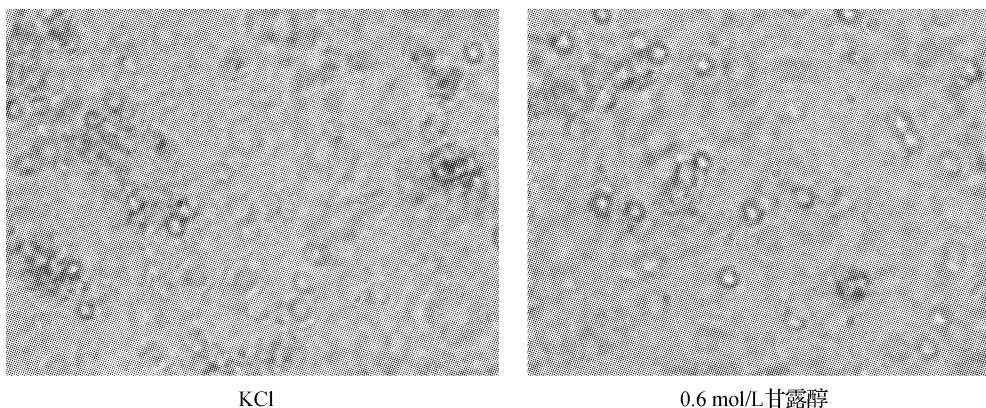


图6 渗透压稳定剂对原生质体的产率的影响

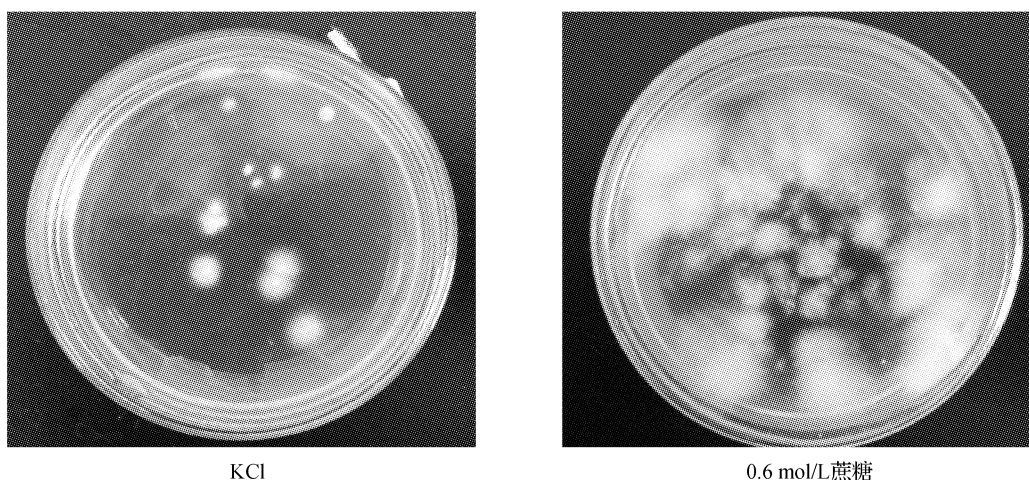
Fig. 6 Effects of osmotic pressure stabilizer on productivity of *Ganoderma lucidum* protoplast

图7 再生培养基中不同渗透压稳定剂对原生质体再生的影响

Fig. 7 Effects of osmotic pressure stabilizer on regeneration of *Ganoderma lucidum* protoplast in regeneration medium

3 结论

灵芝原生质体的制备是其遗传研究和基因工程研究的一个重要组成部分。原生质体的制备与再生涉及多种因素,综上所述,泰山灵芝原生质体的制备最佳方案为菌龄7 d的泰山灵芝,用0.6 mol/L的甘露醇配置2.0%的溶壁酶在31℃、pH为6.0的条件下酶解2.5 h。所得到的原生质体涂布于0.6 mol/L蔗糖配置

的MYG再生培养基,原生质体的再生率最高。

参考文献

- [1] 孙金旭,张卿,朱会霞. 优化灵芝真菌发酵条件的研究[J]. 中国酿造, 2008(4):27-29.
- [2] 于智勇. 灵芝-仙草[J]. 生物学杂志,1995(3):25.
- [3] Vries de O M H, Wessels J G H. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride*[J]. J Gen Microbiol,1972,73:13-22.

Study on Preparation and Regeneration of the Protoplasts from *Ganoderma lucidum*

WANG Yu, WANG Yi, WANG Kang-yu, YE Peng-fei, SUN Chun-yu, ZHANG Mei-ping
(College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Taking *Ganoderma lucidum* as the material, the effect of Taishan *Ganoderma lucidum*'s fungus age, enzyme concentration, enzyme solution time, enzyme solution temperature, enzyme solution pH, osmotic pressure stabilizer on plasma system and the regeneration were studied. The results showed that fungus age for 7 days, with mannitol for osmotic pressure stabilizer, the enzyme concentration 2.0%, soluble wall enzyme, pH 6.0, under the condition of the enzyme solution 2.5 h was the optimum; and in MYG medium (0.6 mol/L sucrose for osmotic pressure stabilizer), protoplast regeneration had the highest rate.

Key words: *Ganoderma lucidum*; protoplast; preparation; regeneration