

茯苓原生质体制备与再生条件初探

梁清乐, 王秋颖*, 曾念开, 王怀凯

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

摘要:目的 研究茯苓原生质体制备及其再生条件。方法 采用不同菌龄、酶液浓度、酶解时间、稳渗剂对茯苓原生质体产率及再生条件进行研究。结果 不同菌龄、酶液浓度、酶解时间、稳渗剂对茯苓原生质体产率及再生产生不同影响。结论 Z_{10-2} 原生质体制备时菌丝最适菌龄为 72 h, 酶液浓度为 3%, 稳渗剂以 0.5 mol/L 的甘露醇为佳。 Z_{10-3} 原生质体制备时菌丝最适菌龄为 56 h, 酶液浓度为 3%, 稳渗剂以 0.6 mol/L 的甘露醇为佳。 Z_{10-2} 和 Z_{10-3} 原生质体均以甘露醇作稳渗剂再生率较高, 其最佳浓度为 0.6 mol/L。在该条件下 Z_{10-2} 原生质体再生率为 7.5×10^{-3} , Z_{10-3} 为 1.3×10^{-2} 。

关键词: 茯苓; 原生质体; 形成; 再生

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)05-0773-03

Separation and regeneration of *Poria cocos* protoplast

LIANG Qing-le, WANG Qiu-ying, ZENG Nian-kai, WANG Huai-kai

(Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Abstract: **Objective** To study the conditions of separation and regeneration of *Poria cocos* protoplast. **Methods** Separation and regeneration of *P. cocos* protoplast under different ages of hyphae, enzyme consistency, and enzymolysis time and stabilizer. **Results** The results showed that the yield of the protoplast was different under different ages of hyphae, enzyme concentration, enzymolysis time, and stabilizer. **Conclusion** For strain Z_{10-2} , its optimal age of hyphae, enzyme concentration, and stabilizer is 72 h, 3%, and 0.5 mol/L mannitol, respectively. The strain Z_{10-3} is 56 h, 3%, and 0.6 mol/L mannitol. The frequency of regeneration of the two strains is the best and 7.5×10^{-3} (strain Z_{10-2}) and 1.3×10^{-2} (strain Z_{10-3}) separately when the stabilizer is 0.6 mol/L mannitol.

Key words: *Poria cocos* (Schw.) Wolf; protoplast; separation; regeneration

1972 年荷兰的 De Vries 和 Wessels, 用从 *Trichodemaviride* 中制备的裂解酶分离了裂褶菌的原生质体, 随后又分离了双孢蘑菇和草菇的原生质体。1980 年以后, 由于商品脱壁酶的出现, 开始有大量的关于从真菌中分离原生质体的报道^[1,2]。食、药用菌原生质体技术在 20 世纪 80 年代得到了迅速发展和广泛应用, 现在已是食、药用菌生理、生化、遗传等基础理论研究和菌种改良的一种重要方法和有效工具^[3]。

传统中药茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf, 几千年来被广泛用于临床治疗和人体保健。目前茯苓有效成分茯苓多糖的研究较为深入, 也有较多的茯苓新疗效、新用途的报道。但研究主要集中在栽培、化学、药理及临床应用等方面, 而茯苓的遗传育种研究甚少, 本实验对茯苓原生质体制备与再生条件进行

了初步探索。

1 材料

1.1 菌种: Z_{10-2} 由中国医学科学院药用植物研究所真菌室提供, Z_{10-3} 由福建三明真菌研究所提供。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: 麦麸 5% (水煮 0.5 h, 滤过, 取滤汁), 葡萄糖 2%, 磷酸二氢钾 0.3%, 硫酸镁 0.15%, V_B 0.001%, 琼脂 1.5%, pH 值自然。

1.2.2 发酵培养基: 麦麸 5% (水煮 0.5 h, 滤过, 取滤汁), 葡萄糖 2%, 磷酸二氢钾 0.3%, 硫酸镁 0.15%, V_B 0.001%, pH 值自然。

1.2.3 再生培养基: 马铃薯 10% (水煮 0.5 h, 滤过, 取滤汁), 酵母粉 0.3%, 蛋白胨 0.5%, 葡萄糖 2%, 磷酸二氢钾 0.2%, 硫酸镁 0.1%, 硫酸铵 0.1%, V_B 0.001%, 琼脂条 1.5% (煮溶)。

1.2.4 高渗再生培养基:再生培养基中加入 0.5 mol/L 甘露醇作为稳渗剂。

1.3 试剂:0.1 mol/L Tris-0.1 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-0.1 mol/L EDTA 配制的 0.2% 巯基乙醇;稳渗剂 KCl、NaCl、甘露醇、蔗糖;50 mmol/L CaCl₂ 的 30% 聚乙二醇 (PEG6000) (北京欣经科试剂公司);溶壁酶 (广东省微生物研究所);蜗牛酶 (北京欣经科试剂公司)。

2 方法

2.1 原生质体的制备

2.1.1 酶液制备:用灭菌的 0.5 mol/L 渗透压稳定剂配制,酶溶解后 5 000 r/min 离心 10 min,去掉沉淀杂质,上清液用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过除菌,4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

2.1.2 菌种培养:将菌株 Z₁₀₋₂、Z₁₀₋₃ 从试管斜面挑取数小块,分别接种于 150 mL 麦麸液体培养基中,28 $^{\circ}$ C 下摇床培养 7 d,然后滤过收集菌丝,用无菌水冲洗后,用研钵磨,取 Z₁₀₋₂、Z₁₀₋₃ 各 10 mL 分别再接入 150 mL 新培养基中培养,温度为 28 $^{\circ}$ C,做以下处理。

2.1.3 菌龄试验:分别取培养 24、32、40、48、56、72、96 h 的 Z₁₀₋₂、Z₁₀₋₃ 菌丝,铜网滤过收集菌丝,用无菌水将菌丝冲洗干净→0.1 mol/L Tris-0.1 mol/L EDTA 冲洗→0.2% 巯基乙醇处理 30 min,温度为 28 $^{\circ}$ C,振荡→铜网收集菌丝,用 0.5 mol/L 甘露醇冲洗→将收集的菌丝在 1 500 r/min 下离心 10 min→称取 0.25 g 菌丝体加上 1 mol 3% 酶液,28 $^{\circ}$ C 振荡酶解 2.0 h→铜网滤过→滤液离心 500 r/min,5 min 2 次,去掉菌丝段→3 500 r/min 下离心 10 min,得到沉淀即为原生质体→将沉淀用稳渗剂洗涤离心 2 次,然后用血球计数板计数。

2.1.4 酶浓度试验:所用蜗牛酶、溶壁酶的酶浓度分别为 1%、2%、3%、4%,取培养 56 h 的 Z₁₀₋₃、72 h 的 Z₁₀₋₂ 的菌丝进行处理,操作步骤同 2.1.3,然后用血球计数板计数。

2.1.5 酶解时间试验:所用蜗牛酶、溶壁酶的酶浓度为 3%,取培养 56 h 的 Z₁₀₋₃、72 h 的 Z₁₀₋₂ 的菌丝进行处理,酶解时间为 1.5、2、2.5、3 h,操作步骤同 2.1.3,血球计数板计数。

2.1.6 稳渗剂试验:采用 0.4、0.5、0.6 mol/L KCl, 0.4、0.5、0.6 mol/L 蔗糖和 0.4、0.5、0.6 mol/L 甘露醇作为稳渗剂,取培养 56 h 的 Z₁₀₋₃、72 h 的 Z₁₀₋₂ 的菌丝,酶液浓度为 3%,操作步骤同 2.1.3,血球计数板计数。

2.2 原生质体再生

2.2.1 不同稳渗剂的试验:分别采用 0.5 mol/L KCl, 0.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L 蔗糖,0.5 mol/L 甘露醇作为稳渗剂加入到完全培养基中,取制备好的原生质体 0.1 mL 涂皿,使每皿原生质体数目达到 10⁴ 个/mL,28 $^{\circ}$ C 下培养,观察平皿中的再生菌落数,计算再生率。

原生质体再生率=再生菌落数/原生质体总数

2.2.2 不同浓度的稳渗剂试验:分别用 0.4、0.6、0.8 mol/L 甘露醇作为稳渗剂加入到完全培养基中,每皿原生质体数目达到 10⁴ 个/mL,28 $^{\circ}$ C 下培养,观察平皿中的再生菌落数,计算再生率。

3 结果与讨论

3.1 原生质体制备

3.1.1 菌龄对茯苓原生质体产量的影响:从表 1 可以看出,Z₁₀₋₂ 菌丝酶解的最适菌龄为 72 h,Z₁₀₋₃ 菌丝酶解的最适菌龄为 56 h,且 Z₁₀₋₃ 菌丝在 56 h 时,原生质体个体较大,适于融合,为最适菌龄。Z₁₀₋₃ 在培养 96 h 后,得到的原生质体虽然较多,但个体较老,不适于融合。因此,在原生质体制备过程中,菌龄对原生质体的影响很明显。菌龄过小或者过大都将影响原生质体的形成,一般以对数生长期的幼嫩菌丝酶解制备原生质体效果最好,但不同菌种由于其生理生化及生长速度不同,适宜分离原生质体的菌龄亦不同。

表 1 菌龄对原生质体产率的影响

Table 1 Effect of various ages on protoplast yield

菌株	原生质体产量/($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)						
	24 h	32 h	40 h	48 h	56 h	72 h	96 h
Z ₁₀₋₂	1.56	0.50	1.00	2.00	2.75	5.25	1.50
Z ₁₀₋₃	3.25	6.20	4.00	2.50	6.50	6.00	9.25

3.1.2 酶浓度对茯苓原生质体产量的影响:从表 2 中可以看出,Z₁₀₋₂ 菌和 Z₁₀₋₃ 菌株采用 3% 的蜗牛酶和溶壁酶混合酶液酶解菌丝时,其原生质体产量最高,实验证明,茯苓菌丝原生质体的制备需要在一定浓度的酶液中进行,但酶液浓度并非与原生质体产率成正比关系,相反,如果酶液浓度过高,还会造成原生质体变形,但酶液浓度过低酶解效果亦不理想。

表 2 酶液浓度对原生质体产率的影响

Table 2 Effect of various enzyme concentrations on protoplast yield

菌株	原生质体产量/($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	1%	2%	3%	4%
Z ₁₀₋₂	0.56	1.00	3.37	2.00
Z ₁₀₋₃	2.00	1.50	5.37	2.00

3.1.3 酶解时间对茯苓原生质体产量的影响:试验结果见表 3,Z₁₀₋₂菌株采用 3% 酶液酶解 2.0 h 后,其原生质体产量最高,而 Z₁₀₋₃菌株采用 3% 酶液酶解 2.5 h,其原生质体产率最高。实验表明原生质体产率与酶解时间有一定关系,但并不成正比相关,有些菌类如果延长酶解时间,原生质体产率会显著降低,这可能是由于脱壁太彻底或杂酶对原生质体长时间的损伤降低了原生质体的活性和再生。

表 3 酶解时间对原生质体产率的影响

菌株	原生质体产量/(×10 ⁵ ·mL ⁻¹)			
	1.5 h	2.0 h	2.5 h	3.0 h
Z ₁₀₋₂	1.81	5.25	2.81	1.56
Z ₁₀₋₃	3.56	3.68	6.50	5.37

3.1.4 不同稳渗剂对茯苓原生质体产量的影响:脱去了细胞壁的原生质体是很脆弱的,需要特定的等渗溶液来悬浮原生质体,原生质体在分离、再生及融合过程中都离不开渗透压稳定剂的保护。稳渗剂的种类和浓度对原生质体的分离有着较大影响,本实验选用不同浓度的 KCl、蔗糖、甘露醇稳渗剂对茯苓进行酶解对比试验,结果见表 4。对于 Z₁₀₋₂,0.5 mol/L 甘露醇作稳渗剂时所得原生质体数量最多,且原生质体大小均匀,其次为蔗糖,KCl 最差;Z₁₀₋₃以 0.6 mol/L 甘露醇作稳渗剂所得原生质体最多,蔗糖次之,KCl 最次。因此,最适合的渗透压稳定剂条件需要根据不同供试菌株来确定。

3.2 原生质体再生

3.2.1 不同种类的稳渗剂对茯苓原生质体产量的影响:由表 5 可以看出甘露醇作稳渗剂对茯苓原生质体的再生效果最佳。其次为蔗糖,而无机盐 NaCl、KCl 效果较差。且 Z₁₀₋₂在 NaCl 为稳渗剂的条件下几乎不能再生。

3.2.2 不同浓度的稳渗剂对茯苓原生质体产量的

影响:由表 6 可以看出,同一种稳渗剂不同的浓度其原生质体再生率也不同,0.6 mol/L 甘露醇作为稳渗剂时其原生质体再生率最高。

表 4 不同稳渗剂对原生质体产率的影响

Table 4 Effect of various stabilizers on protoplast yield

稳渗剂	浓度/ (mol·L ⁻¹)	原生质体产量/(×10 ⁵ ·mL ⁻¹)	
		Z ₁₀₋₂	Z ₁₀₋₃
KCl	0.40	1.50	0.50
	0.50	0.56	0.75
	0.60	0.75	0.25
蔗糖	0.40	0.50	0.50
	0.50	1.25	1.00
	0.60	1.50	0.25
甘露醇	0.40	0.50	0.50
	0.50	2.00	1.75
	0.60	1.50	2.50

表 5 不同种类的稳渗剂对原生质体再生的影响

Table 5 Effect of various kinds of stabilizers on protoplast regeneration

菌株	原生质体再生率			
	0.5 mol/L 蔗糖	0.5 mol/L 甘露醇	0.5 mol/L KCl	0.5 mol/L NaCl
Z ₁₀₋₂	0.75×10 ⁻²	1.00×10 ⁻²	2.50×10 ⁻³	—
Z ₁₀₋₃	1.30×10 ⁻²	1.66×10 ⁻²	6.70×10 ⁻³	2.50×10 ⁻³

表 6 不同浓度的稳渗剂对原生质体再生的影响

Table 6 Effect of various concentrations of stabilizers on protoplast regeneration

菌株	原生质体再生率		
	0.4 mol/L 蔗糖	0.6 mol/L 甘露醇	0.8 mol/L 甘露醇
Z ₁₀₋₂	2.5×10 ⁻³	7.5×10 ⁻³	5.0×10 ⁻³
Z ₁₀₋₃	1.0×10 ⁻²	1.3×10 ⁻²	6.7×10 ⁻³

References:

[1] Chang S T, Miles P E. *Edible Mushrooms and Their Cultivation* Boca Raton [M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989.
[2] Chang S T. *Genetics and Breeding of Edible Mushrooms* [M]. Yverdon; Gorden and Brenc Science Publishers, 1992.
[3] Yang X M. *Investigation Technique of Edible Mushrooms* (食用菌研究法) [M]. Beijing: China Agriculture Publishing House, 1998.

RP-HPLC 法测定厚朴中厚朴碱

刘明哲,邹玉红,陈晓辉,毕开顺*

(沈阳药科大学药学院,辽宁 沈阳 110016)

厚朴为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 或凹叶厚朴 *M. officinalis* Rehd.

et Wils. subsp. *biloba* (Rehd. et Wils.) Cheng et Law 的干燥干皮、根皮和枝皮。厚朴中主要有效成

收稿日期:2005-07-30
作者简介:刘明哲(1980—),男,满族,河北保定人,在读硕士,主要从事中药质量标准的研究。
Tel: (024) 23986296 E-mail: liumz80@yahoo.com.cn
* 通讯作者 毕开顺