22 July 2020, 39(7): 1356-1367 Mycosystema ISSN1672-6472 CN11-5180/Q

利用荧光染色和流式细胞技术辅助卵孢小奥德蘑原生质体 制备与再生研究

徐丽丽 王菲 胡春辉 郭立忠 于浩[€]

山东省应用真菌重点实验室 青岛农业大学生命科学学院 山东 青岛 266109

摘 要:本研究以卵孢小奥德蘑液体培养菌丝作为实验材料,利用单因子变量法探索研究了菌丝培养时 间、酶浓度、酶解时间、酶解温度、稳渗剂类型对卵孢小奥德蘑原生质体制备的影响,并对原生质体再 生培养基进行选择和优化。通过荧光染色,利用激光共聚焦显微镜和流式细胞仪对原生质体的制备过程、 得率和活力进行研究。结果表明,将卵孢小奥德蘑菌丝在液体培养基中培养 5d 收集菌丝体,以甘露醇作 为渗透压稳定剂,在溶壁酶浓度 2%、30℃条件下酶解 5h,获得的原生质体得率最高,达 2.0×10⁷ 个/mL; 通过流式细胞仪分析,约 57.69%的原生质体细胞为活细胞;在 RM 培养基中再生效果最好,再生率为 (0.103±0.025)%。研究结果可以为卵孢小奥德蘑育种与食用菌原生质体制备再生提供研究基础。 关键词:卵孢小奥德蘑,原生质体制备,原生质体再生,荧光染色,流式细胞术

[引用本文] 徐丽丽,王菲,胡春辉,郭立忠,于浩,2020. 利用荧光染色和流式细胞技术辅助卵孢小奥德蘑原生质体制备 与再生研究. 菌物学报,39(7):1356-1367 Xu LL, Wang F, Hu CH, Guo LZ, Yu H, 2020. Protoplast preparation and regeneration of *Oudemansiella raphanipes* using fluorescent staining and flow cytometry. Mycosystema, 39(7): 1356-1367

Protoplast preparation and regeneration of *Oudemansiella raphanipes* using fluorescent staining and flow cytometry

XU Li-Li WANG Fei HU Chun-Hui GUO Li-Zhong YU Hao[©]

Shandong Province Key Laboratory of Applied Mycology, The College of Life Sciences, Qingdao Agriculture University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: The single-factor experiment was used to analyze the effects of mycelium cultivation time, enzymolysis time, enzymolysis temperature, enzyme concentration, and type of osmotic stabilizer on the preparation of the protoplast in *Oudemansiella raphanipes*. The medium for protoplast regeneration was optimized. Through fluorescence staining, the process of protoplast preparation was observed by laser

O Corresponding author. E-mail: yuhaosunshine@163.com

ORCID: XU Li-Li (0000-0003-2212-1965), YU Hao (0000-0002-1892-7993)

1356 菌物学报 Copyright © 2020 Institute of Microbiology, CAS. All rights reserved. | jwxt@im.ac.cn Http://journals-myco.im.ac.cn Tel: +86-10-64807521

基金项目:山东省现代农业产业技术体系食用菌创新团队(SDAIT-11-011-02);十三五国家重点研发计划"现代食品加工 及粮食收储运技术与装备"重点专项(2018YFD0400200)

Supported by Shandong Modern Agricultural Technology System Edible Fungus Innovation Team (SDAIT-11-011-02), The 13th Five-year National Key Research and Development Plan (2018YFD0400200).

Received: 2019-11-22, accepted: 2019-12-20

scanning confocal microscope, and the yield and viability of protoplasts were determined by flow cytometer. The results showed that the highest protoplast production was 2.0×10⁷ cells/mL under the optimal conditions as follows: cultivation in liquid medium for 5 days, using mannitol as osmotic pressure stabilizer, and lywallzyme digestion for 5h at the enzyme concentration of 2% under 30°C. Flow cytometer analysis indicated that about 57.69% of the protoplast cells were alive. In the optimal solid regeneration medium (RM), the regeneration rate of protoplasts was (0.103±0.025)%.

Key words: *Oudemansiella raphanipes* (*Hymenopellis raphanipes*), protoplast preparation, protoplast regeneration, fluorescent dye, flow cytometry

卵孢小奥德蘑 Oudemansiella raphanipes (Berk.) Pegler & T.W.K. Young, 俗称长根菇, 属 于担子门、伞菌纲、伞菌目、膨瑚菌科,又名长 根小奥德蘑、长根金钱菌、草鸡纵、黑皮鸡纵等, 卵孢小奥德蘑肉质鲜嫩,富含各种氨基酸、多糖 和微量元素 (Yang 2000; 戴玉成等 2010; Hao et al. 2016; 欧胜平等 2017; Wang et al. 2018)。 其中从卵孢小奥德蘑子实体和发酵液中提取的 小奥德蘑酮对原发性高血压有较好的降血压效 果(Koizumi et al. 1982; 江枝和等 2003; Roas et al. 2005; Acharya et al. 2019; Wu et al. 2019) 。 卵孢小奥德蘑具有较高的经济价值,近几年被成 功驯化人工栽培,但是人工栽培的产量低、生产 周期长且培养过程中易受霉菌和黏菌感染,另外 对生长环境要求也较为严格,目前亟需具有优良 栽培性状的卵孢小奥德蘑新品种。

原生质体是细胞去除细胞壁后对渗透压较 为敏感的球质体,该细胞具有完整的细胞学和遗 传学功能,同时具有较强的遗传交换和重组能 力,且在一定培养条件下能够再生成具有细胞壁 的完整细胞,因此原生质体是真菌遗传育种的重 要实验材料(Suo et al. 2019)。原生质体的制备 与再生技术被广泛地应用于食用菌菌种的复壮、 脱毒、诱变育种、单核菌丝筛选和融合育种等过 程中。不同种类的真菌由于细胞壁结构组成和代 谢组分的差异较大,因此不同真菌的原生质体制 备方法也存在较大差异,菌丝的培养时间、酶解 温度、稳定剂类型、酶解时间、酶的种类和酶浓 度等对原生质体的产量和活性有较大的影响 (Guo & Zhao 2009; Ting & Cuo 2012; Zhao & Liu 2013; Cheng *et al.* 2017)。目前关于卵孢小奥 德蘑原生质体制备和再生的研究尚未见报道。

原生质体制备得率主要是利用血球计数板 通过统计原生质体细胞个数的方法计算得出,该 方法操作简单,但是存在较大的误差,该方法的 缺点在于不能区分死细胞和活细胞。传统的原生 质体活力检测方法主要是通过原生质体再生培 养,但是再生过程较长(一般 5-7d),再生培养 条件(如温度、培养基的选择等)对再生率的影 响较大。流式细胞术作为快速检测细胞数量的方 法,配合特异的荧光染料,能够快速准确地对原 生质体的得率和活力进行分析(胡晓棣等 2016; Laimbeer et al. 2017; 孔瑶等 2018)。在之前的 卵孢小奥德蘑育种研究中,我们采用双单杂交的 方法选育出了一株生长迅速且具有木霉抗性的 新菌株 OuCE08, 在本研究中, 以 OuCE08 为实验 材料, 对卵孢小奥德蘑原生质体的制备与再生进 行了研究。探索了卵孢小奥德蘑的原生质体制备 条件;利用荧光染料分别对细胞核和细胞壁进行 染色,利用激光共聚焦显微镜实时观察原生质体 的制备过程,利用流式细胞仪快速检测原生质体 制备的得率并区分死细胞和活细胞, 建立了卵孢 小奥德蘑原生质体的制备和再生方法,为卵孢小 奥德蘑的遗传转化和相关功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

1.1.1 供试菌株: 卵孢小奥德蘑菌株 OuCE08 来

源于山东省应用真菌重点实验室。

1.1.2 主要试剂与仪器设备:溶壁酶购自广东省 微生物研究所; PI (propidium iodide)荧光染料 购自 Sigma 公司,用无菌水配置成 50µg/mL 母液, 使用时用无菌水稀释成 20µg/mL 工作液;刚果红 购自上海试剂三厂,称取 1g 刚果红溶解到 100mL 蒸馏水中配置成终浓度为 1% (*M/V*)工作液。激 光共聚焦显微镜(Leica TCS SP5,德国莱卡公司); 流式细胞仪(BD Calibur,美国 BD 公司)。

1.2 培养基

马铃薯液体培养基: 200g 新鲜马铃薯(切 块,煮30min,过滤留汁用,下同),葡萄糖20g, 蒸馏水1000mL。马铃薯固体培养基(简称PDA): 200g 新鲜马铃薯,葡萄糖20g,蒸馏水1000mL, 20g 琼脂粉。再生固体培养基(简称RM):200g 新鲜马铃薯,葡萄糖10g,麦芽糖5g,酵母粉 5g,甘露醇109.32g,蒸馏水1000mL,20g 琼脂 粉。完全固体培养基(简称CYM):20g 葡萄糖, 2g 蛋白胨,1g 酵母膏,0.5g 七水硫酸镁,0.46g 磷酸二氢钾,1g 磷酸氢二钾,蒸馏水1000mL, 20g 琼脂粉。麦芽浸汁固体培养基(简称 MYG): 5g 麦芽糖,5g 酵母膏,10g 葡萄糖,109.32g 甘 露醇,蒸馏水1000mL,20g 琼脂粉。

1.3 原生质体制备方法和条件

1.3.1 菌丝培养时间对原生质体制备的影响:无 菌条件下将卵孢小奥德蘑菌丝接种到马铃薯液 体培养基中,在 25℃恒温培养箱中振荡(摇床 转速为 170r/min)培养 2d、3d、4d、5d、6d, 常温条件下 8 000r/min 离心 15min 收集菌丝, 用无菌水冲洗菌丝;取 0.1g 菌丝转移至 2mL无 菌离心管中,加入终浓度为 0.6mol/L 甘露醇作 为稳渗剂,加入 1mL 浓度为 15mg/mL 溶壁酶, 30℃条件下酶解 3h。酶解结束后将菌丝酶解液通 过含有脱脂棉的注射器过滤,以除去大段菌丝, 将所得滤液经 300 目筛网过滤,得到较纯的原生 质体悬液,将所得滤液室温下 2 000r/min 离心 15min,弃上清,得到原生质体沉淀;用稳渗剂 冲洗 2 次,弃上清,保留沉淀;用 1mL 0.6mol/L 稳渗剂重悬沉淀。每个摇瓶设置 3 个重复。将得 到的原生质体用血球计数板计数,以确定菌丝的 最佳培养时间。

1.3.2 不同稳渗剂对原生质体制备的影响:选取 培养 5d 的菌球,离心收集菌体,选用 6 种不同 的稳渗剂(山梨醇、氯化钠、甘露醇、蔗糖、氯 化钾、硫酸镁)进行实验,将收集得到的菌丝均 分成 6 份,用无菌水冲洗一遍,然后用 0.6mol/L 的稳渗剂冲洗两次,用滤纸吸干水分,称量 0.1g 菌丝置于灭过菌的离心管中,分别对应地加入用同 种稳定剂配置的酶解液(酶液浓度为 15mg/mL), 30℃条件下酶解 3h。每种稳渗剂设置 3 个重复, 将得到的原生质体用血球计数板计数,以确定最 适的稳渗剂。

1.3.3 酶浓度对原生质体制备的影响:选取培养 5d 的菌丝,离心收集菌体,选用 0.6mol/L 甘露 醇作为稳渗剂进行实验,酶解液浓度梯度设置为 10、20 和 30mg/mL,取 0.1g 菌丝转移至 2mL 无菌离心管中,加入 1mL 不同浓度的溶壁酶, 30℃条件下酶解 3h。每个酶液浓度设置 3 个重 复,将得到的原生质体用血球计数板计数,以确 定最佳的酶液浓度。

1.3.4 酶解温度对原生质体制备的影响:选取培养 5d 的菌丝,离心收集菌体,选用 0.6mol/L 甘露醇作为稳渗剂进行实验,取 0.1g 菌丝转移至新的 2mL 无菌离心管中,加入 1mL 浓度为 20mg/mL 溶壁酶,分别在 24℃、27℃、30℃、33℃条件下酶解 3h。每个酶解温度设置 3 个重复,将得到的原生质体用血球计数板计数,以确定最佳的酶解温度。

1.3.5 酶解时间对原生质体制备的影响:选取培养 5d 的菌球,离心收集菌体,选用 0.6mol/L 甘露醇作为稳渗剂进行实验,取 0.1g 菌丝转移至 2mL 无菌离心管中,加入 1mL 浓度为 20mg/mL 溶壁酶,于 30℃条件下分别酶解 2h、3h、4h、5h。每个温度重复 3 次,将得到的原生质体用血

球计数板计数,以确定最佳的酶解时间。

1.4 原生质体染色与观察

以甘露醇作为渗透压稳定剂,在酶浓度 2%、 30℃条件,进行酶解,每隔 30min 取样观察菌 丝的形态变化。

分别取一滴原生质体溶液滴加到干净的载 玻片上,滴加 20μL 刚果红(红色,激发波长为 561nm,发射波长为 580-620nm)对细胞壁进行 染色,盖上盖玻片,置于激光共聚焦显微镜下进 行观察;取 200μL 酶解的原生质体溶液加入 40μL 25%戊二醛溶液室温固定 1h 以上,取一滴固定 后的液体滴加到干净的载玻片上,滴加 10μL PI 染料(红色,激发波长为 561nm,发射波长为 580-680nm)对细胞核进行染色,盖上盖玻片, 置于激光共聚焦显微镜下进行观察。通过 Leica LAS AF 软件采集图像。

1.5 原生质体活力分析

取 500µL 酶解后的原生质体悬浮液,300 目 筛网过滤至流式管中,利用流式细胞仪进行检 测。分析参数为:输出功率为 150mW,488nm 激光器激发,电压设定值为 FSC(forward scatter) 530V、SSC(side scatter)560V 和 FL3 为 550V。 每管收集 100 000 个颗粒进行参数统计,在通用 工作页面上做散点图进行获取和分析。

1.6 原生质体再生

按照确定的最佳条件制备原生质体并计数, 用 0.6mol/L 甘露醇将原生质体溶液稀释至原生 质体数为 5.6×10⁴ 个/mL,取 300µL 稀释后的原 生质体溶液加入到 50℃左右 50mL 的 RM、PDA、 MYG 和 CYM 4 种再生培养基中,混匀,每种培 养基倒 3 个平板。将平板置于 25℃恒温培养箱 培养,每天观察并记录菌落生长情况,将再生出 来的菌落转接到新的平板上。采用无菌水低渗裂 解 30min 的原生质体作为对照,涂布平板,以 去除非原生质体生长的菌落造成的误差。

原生质体再生率的计算公式为:原生质体再 生率=(原生质体再生菌落数-对照组菌落数)/原 生质体总数×100%。

1.7 数据统计与分析

原生质体计数方法:采用横竖格为 25×16 血 球计数板,在光学显微镜下对细胞悬液进行计 数。计算公式为:原生质体细胞数量/mL=(80 小格 内原生质体数/80)×4×10⁶×稀释倍数。用 Origin8.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 原生质体酶解条件的确定

分别收集不同培养时间的菌丝制备原生质 体, 菌龄对原生质体释放的影响见图 1。从 2-5d 卵孢小奥德蘑菌丝培养时间越长得到的原生质 体数量越多,在第5天原生质体的释放量最大, 菌丝培养到第6天酶解处理得到的原生质体显著 降低,因此确定卵孢小奥德蘑制备原生质体的最 适菌龄为 5d: 在其他条件一致的情况下, 比较 山梨醇、氯化钠、甘露醇、蔗糖、氯化钾、硫酸 镁这6种试剂作为稳渗剂对原生质体释放的影响, 甘露醇作为稳渗剂对原生质体的释放效果最 好: 洗用菌龄 5d 的菌丝, 使用甘露醇作为稳渗 剂,比较不同酶浓度对原生质体释放的影响, 酶液浓度为 2%时原生质体的释放量高于使用 1%的酶液(图2),但是随着酶液浓度的进一步 升高(3%)原生质体的释放量反而降低(图3), 因此后续试验中采用 2%的酶液浓度:在上述确 定的最适酶解条件下(菌龄 5d, 甘露醇作为稳 渗剂,2%的酶液浓度),探索酶解时间对原生质 体释放量的影响(图4),随着酶解时间的延长, 原生质体的得率越来越高,在 5h 达到最高,达 到 23.1×10⁶个/mL, 随后随着酶解时间的增长, 原生质体的得率开始不断降低,5-6h 原生质体 得率最高,因此确定最适酶解时间为 5h: 温度 对于酶促反应有很大的影响,因此本文研究了反 应温度对原生质体得率的影响,该反应的最适反 应温度为 30℃, 其次为 33℃和 27℃(图 5)。综 合以上实验结果,得出卵孢小奥德蘑原生质体制



图 1 菌龄对原生质体释放的影响

Fig. 1 Effects of mycelium age on protoplast production.



图 2 稳渗剂对原生质体释放的影响

Fig. 2 Effects of osmotic agent on protoplast production.





Fig. 3 Effects of enzyme concentration on protoplast production.



图 4 酶解时间对原生质体释放的影响

Fig. 4 Effects of enzyme digestion time on protoplast production.



图 5 酶解温度对原生质体释放的影响

Fig. 5 Effects of enzyme digestion temperature on protoplast production.

备的最适反应条件为:培养 5d 的菌丝、甘露醇 作为稳渗剂、酶液浓度 2%、反应温度 30℃、酶 解 5h。

2.2 染色剂筛选和原生质体观察

刚果红与菌丝表面的细胞壁多糖反应形成 红色复合物,该物质在 561nm 激光器照射下发 射红色荧光(发射波长为 580-620nm); PI 是细 胞核染色剂,它能够和双链 DNA 结合,在 561nm 激光器作用下发射红色荧光,但是 PI 不能透过 细胞膜,因此不能对活细胞进行染色,需要固定 剂固定以增加细胞膜的通透性。实验结果表明, 刚果红可以对活细胞的细胞壁进行着色,未酶解 的菌丝(或细胞)以及碎片都被染成红色;未固定的细胞使用 PI 染液染色后没有荧光信号,而固定后的细胞核被染成红色(图 6B 和 6E 为菌丝细胞核;6H 为原生质体细胞核)。因此实验中选用刚果红对菌丝(或细胞)的细胞壁进行染色,观察菌丝(或细胞)的形态变化:未酶解的菌丝(或细胞)会被染成红色,酶解不彻底的菌丝会被染成红色,酶解掉的细胞壁碎片也会被染成红色,而完全酶解得到的原生质体不会着色;选用 PI 染料对固定后的细胞进行染色,观察菌丝的细胞核。

以甘露醇作为渗透压稳定剂,在酶浓度 2%、 30℃条件下,制备卵孢小奥德蘑的原生质体,每 隔 30min 取样,利用刚果红染料对细胞进行染色 观察酶解过程中菌丝的形态变化(图7)。未酶解 (0h)的菌丝能够被刚果红染成红色,结构完整, 隔膜清晰,菌丝呈透明状(图7A,7B,7C);酶 解 30min 后菌丝细胞壁被刚果红染成红色,但 是隔膜消失,在明场中观察到菌丝内部有小泡状 透明颗粒出现(图7D,7E,7F);酶解1h后菌 丝内部的透明小泡聚集到菌丝的特定部位;酶解 1.5h 后在内部透明小泡聚集的上下两端产生新 的隔膜(图7J,7K,7L),取样固定后PI染色观 察,这些透明小泡能够被PI染成红色,推测其 为DNA(图6D,6E,6F);酶解2h可以看到制



图 6 固定后菌丝和原生质体 PI 染色观察 A: 未酶解菌丝 PI 染色的明场图; B: 未酶解的菌丝 PI 染色的荧光图; C: 未 酶解的菌丝 PI 染色的 merge 图; D: 酶解 1.5h 的菌丝 PI 染色的明场图; E: 酶解 1.5h 的菌丝 PI 染色的荧光图; F: 酶解 1.5h 的菌丝 PI 染色的 merge 图; G: 原生质体 PI 染色的明场图; H: 原生质体 PI 染色的荧光图; I: 原生质体 PI 染色的 merge 图 (激光共聚焦显微镜)

Fig. 6 Fluorescence staining of mycelia and protoplast after fixation. A: Bright field image of mycelia staining with PI; B: Fluorescence image of mycelia staining with PI; C: Merge image of mycelia staining with PI; D: Bright field image of mycelia staining with PI after digestion for 1.5h; E: Fluorescence image of mycelia staining with PI after digestion for 1.5h; F: Merge image of mycelia staining with PI after digestion for 1.5h; G: Bright field image of protoplasts staining with PI; H: Fluorescence image of protoplasts staining with PI (laser scanning confocal microscopy).

Research paper



图 7 菌丝和原生质体刚果红染色观察 A: 未酶解菌丝刚果红染色的明场图; B: 未酶解菌丝刚果红染色的荧光图; C: 未酶解菌丝刚果红染色的 merge 图; D: 酶解 0.5h 菌丝刚果红染色的明场图; E: 酶解 0.5h 菌丝刚果红染色的荧光图; F: 酶解 0.5h 菌丝刚果红染色的 merge 图; G: 酶解 1h 菌丝刚果红染色的明场图; H: 酶解 1h 菌丝刚果红染色的荧光图; I: 酶解 1h 菌丝刚果红染色的 merge 图; J: 酶解 1.5h 菌丝刚果红染色的明场图; K: 酶解 1.5h 菌丝刚果红染色的荧光图; L: 酶解 1.5h 菌丝刚果红染色的 merge 图; M: 酶解 2h 菌丝刚果红染色的明场图; N: 酶解 2h 菌丝刚果红染色的荧光图; O: 酶解 2h 菌丝刚果红染色的 merge 图; P: 酶解 3h 菌丝刚果红染色的明场图; Q: 酶解 3h 菌丝刚果红染色的荧光图; R: 酶解 3h 菌丝刚果红染色的 merge 图. 图中箭头所指为原生质体小球

Fig. 7 Fluorescence staining of mycelia and protoplast with Congo Red. A: Bright field image of mycelia staining with Congo Red; B: Fluorescence image of mycelia staining with Congo Red; C: Merge image of mycelia staining with Congo Red; D: Bright field image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 0.5h; E: Fluorescence image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 0.5h; F: Merge image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 0.5h; G: Bright field image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 1h; H: Fluorescence image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 1h; I: Merge image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 1h; J: Bright field image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 1.5h; K: Fluorescence image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 1.5h; L: Merge image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 1.5h; M: Bright field image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 2h; N: Fluorescence image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 2h; O: Merge image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 2h; P: Bright field image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 3h; Q: Fluorescence image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 3h; R: Merge image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 2h; P: Bright field image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 3h; Q: Fluorescence image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 3h; R: Merge image of mycelia staining with Congo Red after digestion for 3h. The arrows indicate protoplasts.

1362 菌物学报

备好的原生质体小球和部分细胞壁酶解不完全的原生质体小球(图 7M, 7N, 7O); 酶解 3h 后得到的原生质体见图 7,大小(7.33±0.74)μm, 得到的原生质体不能被刚果红染成红色(图 7P, 7Q, 7R),固定后 PI 能够将其细胞核染成红色 (图 6G, 6H, 6I)。

2.3 原生质体活力的鉴定

传统的血球计数法得到的原生质体的数量

不精确,在统计过程中没有办法区分死细胞和活 细胞。利用流式细胞仪(能够被 PI 染成红色的 细胞或颗粒为非目标颗粒)可以得到有活力的原 生质体数量,减少死细胞和细胞碎片对统计结果 的影响。使用未染色的原生质体作为阴性对照, 样本管使用 PI 染色的原生质体细胞。先上阴性 对照管,在 FSC 和 SSC 散点图圈定目的细胞群(即 图 8A 中的 R1 门)去除细胞碎片,在 FSC 和 FL3



图 8 原生质体的流式分析 A: 未染色的原生质体的散点图, R1 门内为目标细胞; B: 未染色的原生质体的荧光图,显示图 A 中 R1 门内细胞的荧光强度, R2 门内为阴性细胞群; C: PI 染色的原生质体的散点图, R1 门跟图 A 中的一致; D: PI 染色后的 原生质体的荧光图,该图中显示的细胞为图 C 中 R1 门内的所有细胞. R2 门内为阴性细胞群(未染色的原生质体细胞,即有活力的原生质体细胞)

Fig. 8 Flow analysis of the protoplast. A: Scatter plot of protoplasts without staining, the target cells in R1 gate; B: Fluorescent plot of protoplasts without staining indicate the cells inside the R1 gate in Figure A, the negative cells in R2 gate; C: Scatter plot of protoplasts with PI staining, the R1 gate is the same with that in Figure A; D: Flurescent plot of protoplasts with PI staining showing all the cells inside the R1 gate in Figure C, R2 gate showing the negative cells which indicate the unstained, living protoplasts.

散点图上只显示 R1 门中的细胞,在此图中圈出 阴性细胞群(图 8B);上样本管,在 FSC 和 SSC 散点图上设 R1 门(图 8C),在 FSC 和 FL3 散点 图上设定阴性细胞群的位置,R2 门内显示的为 阴性细胞(图 8D),即有活力的原生质体,R2 门以外的细胞为阳性细胞,即能够被 PI 染成红 色的死细胞或碎片。在 FSC 和 FL3 散点图上,阴 性样本中只有一团阴性细胞(总数为10 000 个), 经过 PI 染色的样本管有两团细胞,其中阴性细 胞数为 5 769 个,因此有活力的原生质体占 57.69%。

2.4 培养基类型对原生质体再生的影响

将上述实验中酶解制备的原生质体定容至 5.6×10⁴ 个/mL,取 300µL 分别涂布于 RM、PDA、 CYM 和 MYG 培养基上,置于 30℃恒温培养箱 中进行再生验证不同培养基对再生效果的影 响。2d 后开始有明显的菌落长出,计算再生率 见表 1。

表1 再生培养基与再生率的关系

| Table | 1 | The | relation | between | medium | for | regeneration | and | |
|---------------------------------|---|-----|----------|---------|--------|-----|--------------|-----|--|
| regeneration rate of protoplast | | | | | | | | | |

| 再生培养基 | 再生率 | | | |
|---------------------|------------------------|--|--|--|
| Regeneration medium | Regeneration ratio (%) | | | |
| RM | 0.103±0.025 | | | |
| PDA | 0 | | | |
| СҮМ | 0 | | | |
| MYG | 0.051±0.007 | | | |

3 讨论

原生质体作为重要的遗传转化材料,获得高 质量的原生质体对于卵孢小奥德蘑育种有重要 意义,目前对卵孢小奥德蘑原生质体的制备过程 研究未见报道。通过对最近5年国内发表的食用 菌原生质体制备与再生的报道进行分析,可以发 现正交试验和响应面实验的结果与单因素的结 果基本一致(刘璐等2017;王金斌等2017;陆

欢等 2018:杨珊等 2018:王金斌等 2019),单 因素实验完全可以实现实验目的。因此本研究利 用单因子变量法探索研究菌丝培养时间、酶解条 件、稳定剂的种类对卵孢小奥德蘑原生质体制备 的影响。确定卵孢小奥德蘑原生质体的制备条件 为液体培养菌龄 5d 的菌丝,制备原生质体大部 分都选择液体培养的菌丝(卢月霞等 2015; 崔 晓等 2018;杨珊等 2018),在本次实验中也发 现液体培养的菌丝原生质体制备率要高于固体 菌丝的制备率(结果未展示)。培养时间可能跟 菌丝本身生长状态有关,例如,草菇菌丝生长较 快,其最优时间只有 3.42d(王金斌等 2017)。 如大部分食用菌一样,甘露醇是制备卵孢小奥 德蘑原生质体最优的渗透压稳定剂(崔晓等 2018; 刘宏宇等 2018; 陆欢等 2018; 崔玮洁等 2019)。本研究尝试过不同的溶壁酶,发现广东 省微生物研究所的溶壁酶单独使用完全可以快 速制备原生质体(崔晓等 2018;刘宏宇等 2018; 崔玮洁等 2019),最优酶浓度 2%。在以上条件 下,30℃下酶解5h,获得的原生质体得率最高, 达 2.0×10⁷ 个/mL。根据王金斌等(2017, 2019) 的报道可知食用菌原生质体的再生率与制备率 紧密相关,本研究获得了相同的结果,因此只展 示原生质体的制备率。通过不同的再生培养基再 生实验发现在 RM 培养基中再生效果最好,再生 率为(0.103±0.025)%。可以发现,卵孢小奥德蘑 原生质体再生率较低,已报道的再生率较低的也 有 0.71%(张亚娇等 2015),这可能跟菌种自身 特性有关。不同菌种再生率相差巨大,茯苓的再 生率可达 32.7%, 松茸的再生率可达 41.6%(张 丽和郭成金 2014; 汪琪等 2015), 而较低的金 针菇和金顶侧耳只有不到 1% (陈鹏和郭成金 2014; 张亚娇等 2015)。

已经报道的原生质体制备的酶解过程大部 分是用光镜观察(陈鹏和郭成金 2014;张丽和 郭成金 2014),光学显微镜不能清楚地区分细 胞壁与细胞核,不能辨认制备的原生质体是否 有细胞核存在,而且分辨率不高。荧光染色可 以增加菌丝和原生质体观察的分辨率,并且能 够清楚地区分细胞壁和细胞核(崔玮洁等 2019)。本研究探索利用 PI 和刚果红荧光染料 对卵孢小奥德蘑菌丝进行染色,结果表明刚果 红对细胞壁、PI 对细胞核具有较好的染色效果。 利用激光共聚焦显微镜观察酶解过程中菌丝的 变化过程,用刚果红对活细胞进行染色,可以 清晰地观察到菌丝先是隔膜消失,产生透明小 泡(固定后 PI 染色的结果表明该小泡的主要组 成为 DNA),然后产生新的隔膜,裂解为原生 质体小球。后续研究中可尝试使用不同颜色荧 光染料进行共染色。

卵孢小奥德蘑原生质体的大小为(7.33±0.74)µm。 一根菌丝可以断裂形成多个原生质体小球。在原 生质体制备过程中会产生大量的碎片(主要是酶 解的细胞壁)和死细胞,传统的血球计数板无法 区分死活细胞。流式细胞仪可以快速统计细胞数 量(每秒可以统计上百个细胞),通过设定 FSC 的阈值可以去除细胞碎片,通过 PI 染色可以区 分死活细胞,得到准确的、有活力的原生质体数 量。结合流式的分选技术,能够获得有活力的原 生质体。除能够检测死活细胞之外,实际上流式 细胞术在食用菌遗传育种中还有更加广泛的应 用。杂交育种是食用菌常用的育种方法,该方法 的一个缺点是单核菌丝获取比较慢,虽然可以通 过原生质体再生法迅速获得单核菌丝(崔玮洁等 2019),但是不同种的食用菌相差很大。在本研 究中检测了100个卵孢小奥德蘑原生质体再生后 的菌丝,发现全部为双核菌丝(结果未展示)。 流式细胞仪可以通过细胞核的数量来对单核菌 丝进行初筛,结合原生质体制备再生可以迅速 获得单核菌丝,加快育种进程。原生质体融合 能够实现跨种属的食用菌之间的基因重组,能 够迅速改变原有食用菌的特性,但是由于食用 菌原生质体较脆弱,适合于细菌和酵母菌的致

死因素常常会导致食用菌原生质体的死亡,利 用流式细胞术与荧光标记技术相结合也可以不 经过致死过程而直接筛选融合细胞。激光共聚 焦、流式细胞仪等技术的应用将有助于食用菌 遗传育种研究。

本研究成功地探究并优化了卵孢小奥德蘑 原生质体制备与再生的条件,探索了新技术在食 用菌育种中的应用,为今后卵孢小奥德蘑的遗传 育种提供了研究基础。

[REFERENCES]

- Acharya K, Nandi S, Dutta AK, 2019. Microanatomical and physicochemical characterization and antioxidative activity of methanolic extract of *Oudemansiella canarii* (Jungh.). Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 16(1): 76-81
- Chen P, Guo CJ, 2014. Study on protoplast preparation and regeneration of *Flammulina velutipes*. Jiangsu Academy of Agricultural Science, 42(9): 200-204 (in Chinese)
- Cheng T, Xu X, Zhang W, Chen L, Liu T, 2017. Protoplast preparation from enriched flagellates and resting cells of *Haematococcus pluvialis*. Journal of Applied Microbiology, 124(2): 469-479
- Cui WJ, Zhao YT, Song B, Dai YT, Sun L, Fu YP, Li Y, 2019. Optimization of protoplast preparation of *Auricularia cornea* (yumuer) and variation detection of regenerated strain. Molecular Plant Breeding, 17(18): 6006-6012 (in Chinese)
- Cui X, Cong QQ, Wang QW, An XR, 2018. Study on the separation and regeneration of *Pleurotus pulminarius* protoplast. Edible Fungi of China, 37(5): 44-48 (in Chinese)
- Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, Wen HA, Bau T, Li TH, 2010. A revised checklist of edible fungi in China. Mycosystema, 39(1): 1-21
- Guo CJ, Zhao R, 2009. Study on protoplast preparation and regeneration of *Cordyceps sinesis*. Food Science, 30(5): 166-170
- Hao Y, Zhao Q, Wang S, Yang Z, 2016. What is the radicate *Oudemansiella* cultivated in China. Phytotaxa, 286(1): 1-12

徐丽丽 等 /利用荧光染色和流式细胞技术辅助卵孢小奥德蘑原生质体制备与再生研究

- Hu XD, Li Y, Ren SY, Yao YJ, 2016. Fluorescent staining of septa and nuclei in *Ophiocordyceps sinesis* and *Cordyceps militaris*. Mycosystema, 35(9): 1099-1105 (in Chinese)
- Jiang ZH, Weng BQ, Lin Y, 2003. Nutrition value of protein in *Oudemansiella radiacata*. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 25(3): 439-441 (in Chinese)
- Koizumi S, Nagatsu T, Iinuma H, Ohno M, Takeuchi T, Umezawa H, 1982. Inhibition of phenylalanine hydroxylase, a pterin-requiring monooxygenase, by oudenone and its derivatives. Journal of Antibiotics, 35(4): 458-462
- Kong Y, Feng JJ, Zhang ZQ, Li SL, Song ZW, Guo DW, 2018. Isolation and flow analysis of protoplasts from maize (*Zea mays*) root tip. Journal of Agricultural Biotechnology, 26(12): 2160-2167 (in Chinese)
- Laimbeer FPE, Holt SH, Makris M, Hardigan MA, Buell CR, Veilleux RE, 2017. Protoplast isolation prior to flow cytometry reveals clear patterns of endoreduplication in potato tubers, related species, and some starchy root crops. Plant Methods, 13: 27
- Liu HY, Guo PC, Yao FJ, 2018. Optimization of preparation and regeneration conditions of *Gloeostereum incarnatum* mycelium protoplast. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 43(2): 60-64 (in Chinese)
- Liu L, Gao Y, Du ST, Tian MY, Geng Y, 2017. Protoplast preparation and regeneration of *Lentinus edodes* YJ-01. Edible Fungi, 2017(5): 16-23 (in Chinese)
- Lu H, Wang CH, Jiang XJ, Xu N, 2018. Protoplast preparation and regeneration of *Lepista sordida*. Mycosystema, 37(6): 737-745 (in Chinese)
- Lu YX, Zheng SY, Liu HZ, 2015. Study on protoplast preparation and regeneration of *Coprinus comatus*. Jiangsu Academy of Agricultural Science, 43(7): 260-261 (in Chinese)
- Ou SP, Cheng XH, Gao XX, Li WH, Yang T, Sun L, 2017. Analysis on characteristics and nutritional components of *Oudemansiella raphanipes* by solid culture. Edible Fungi of China, 36(5): 52-59 (in Chinese)
- Roas LH, Cota BB, Katia MG, Machado, Carlos AR, Carlos LZ, 2005. Antifungal and other biological activities from *Oudemansiella canarii* (Basidiomycota). World Journal

of Microbiology & Biotechnology, 21(6-7): 983-987

- Suo XM, Hao J, Yan XM, Wang XE, Feng JZ, Li XY, 2019. Protoplast culture and its application in fruit breeding. Agricultural Biotechnology, 8(3): 147-149, 152
- Ting HE, Guo CJ, 2012. Research on protoplast preparation and regeneration conditions of *Tremella aurantialba*. Agricultural Science & Technology, 67(7): 60-63
- Wang JB, Li W, Jiang W, Bai L, Liu H, Li ZP, Wu WH, Tang XM, 2019. Optimizing conditions for protoplasts preparation and regeneration of *Agaricus bisporus portobello*. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 33(2): 278-289 (in Chinese)
- Wang JB, Li W, Zhang JP, Zhao Y, Chen JZ, Zhu ZP, Tang XM, 2017. Optimizing conditions on protoplast preparation, regeneration by response surface methodology and mutagenesis of *Volvariella volvacea*. Molecular Plant Breeding, 15(10): 4110-4119 (in Chinese)
- Wang Y, Jia J, Ren X, Li B, Zhang Q, 2018. Extraction, preliminary characterization and in vitro antioxidant activity of polysaccharides from *Oudemansiella radicata* mushroom. International Journal of Biological Macromolecules, 120(Pt B): 1760-1769
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. Fungal Diversity, 98: 1-76
- Yang S, Zhang HN, Li QZ, Wu D, Chen MJ, Yang Y, 2018. Optimization of protoplast preparation and regeneration conditions of *Hericium erinareus* fusion breeding. Northern Horticulture, 9: 159-165 (in Chinese)
- Yang W, 2000. Further notes on the genus *Oudemansiella* from southwestern China. Mycotaxon, 74(2): 357-366
- Zhang L, Guo CJ, 2014. Optimizing conditions of protoplast preparation and regeneration of *Tricholoma matsutake* and its release modes. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 26(4): 941-947 (in Chinese)
- Zhang YJ, Chen HJ, Lu MZ, Zhu J, 2015. Study on preparation and regeneration conditions of *Pleurotus citrinipileatus* protoplasts. Edible and Medicinal Mushrooms, 23(1): 39-42 (in Chinese)
- Zhao CH, Liu ZG, 2013. The protoplast preparation of two strains of *Saccharamyces cerevisae*. Advanced Materials Research, 641-642: 898-901

[附中文参考文献]

- 陈鹏, 郭成金, 2014. 金针菇原生质体制备和再生探究. 江 苏农业科学, 42(9): 200-204
- 崔玮洁,赵一橦,宋冰,代月婷,孙磊,付永平,李玉, 2019. 玉木耳原生质体制备条件的优化及再生菌株的 变异检测.分子植物育种,17(18):6006-6012
- 崔晓, 丛倩倩, 王庆武, 安秀荣, 2018. 秀珍菇原生质体 高效制备与再生研究. 中国食用菌, 37(5): 44-48
- 戴玉成,周丽伟,杨祝良,文华安,图力古尔,李泰辉, 2010. 中国食用菌名录. 菌物学报, 29(1):1-21
- 胡晓棣,李熠,任蜀豫,姚一建,2016.冬虫夏草、蛹虫 草菌丝隔膜和细胞核荧光染色.菌物学报,35(9): 1099-1105
- 江枝和,翁伯琦,林勇,2003. 长根菇中蛋白质的营养评价. 江西农业大学学报,25(3):439-441
- 孔瑶,冯娇娇,张政权,李思璐,宋志伟,郭东伟,2018. 玉米根尖组织原生质体的分离和流式分析.农业生物 技术学报,26(12):2160-2167
- 刘宏宇, 郭鹏程, 姚方杰, 2018. 榆耳菌丝原生质体制备 及再生的研究. 东北农业科学, 43(2): 60-64
- 刘璐,高原,杜双田,田梦媛,耿缘,2017.香菇 YJ-01

原生质体制备与再生条件的优化. 食用菌, 5:16-23

- 卢月霞,郑素月,柳焕章,2015. 鸡腿菇原生质体制备与 再生研究. 江苏农业科学,43(7):260-261
- 陆欢,王春晖,姜性坚,徐宁,2018.花脸香蘑原生质体 的制备及再生条件. 菌物学报,37(6):737-745
- 欧胜平,程显好,高兴喜,李维焕,杨涛,孙磊,2017.卵 孢小奥德蘑固体培养特性及营养成分分析.中国食用 菌,36(5):52-59
- 王金斌,李文,蒋玮,白蓝,刘华,李正鹏,吴文惠,唐 雪明,2019. 褐色双孢蘑菇原生质体制备、再生条件 的研究. 核农学报,33(2):278-289
- 王金斌,李文,张俊沛,赵妍,陈建中,祝子坪,唐雪明, 2017. 草菇原生质体制备、再生条件的响应面法优化 及诱变效应.分子植物育种,15(10):4110-4119
- 杨珊,张赫男,李巧珍,吴迪,陈明杰,杨焱,2018. 猴 头菌融合育种原生质体制备与再生条件优化.北方园 艺,9:159-165
- 张丽, 郭成金, 2014. 松茸原生质体制备、再生条件优化 及释放方式观察. 浙江农业学报, 26(4):941-947
- 张亚娇,陈淮洁,卢木造,朱坚,2015. 金顶侧耳原生质 体制备与再生条件的研究. 食药用菌,23(1):39-42

(本文责编:韩丽)