

金龟子绿僵菌原生质体形成和再生的研究

农向群 吴正锐 包建中

(中国农业科学院生防室,北京)

摘要 用 0.5% 纤维素酶和 0.5% 蜗牛酶的混合酶液,以 0.6mol/L KCl 为渗透压稳定剂, pH 6.5 时, 30℃ 处理菌龄为 24 小时的金龟子绿僵菌 3—4 小时, 可从 1 克湿菌丝获得 5×10^7 个以上的原生质体。原生质体在察氏培养基上再生率仅为 0.1—1.2%。但原生质体先在液体中培养再转移到固体平皿上, 再生率可提高到 8%。实验还观察和确证了原生质体的形成及其再生。

关键词 金龟子绿僵菌;原生质体

自从梅契尼科夫(1879)发现金龟子绿僵菌以来,许多研究者对该菌的生物学特性及其应用进行了大量研究。绿僵菌能寄生在鞘翅目、同翅目等 7 个目的 200 多种昆虫上^[1],在害虫的生物防治方面发挥了重要作用,并仍有很大潜力。自然分离到的菌株往往毒力不强或对环境的适应力较弱,需改良后才能应用于生物防治。近年发展起来的原生质体技术已被应用到真菌的遗传学研究和菌种选育工作中,而且取得了一定成果^[3,7,9,12]。这项技术也是选育性状优良,适于生防应用的绿僵菌菌株的一个新手段。

本文报道从绿僵菌菌丝制备原生质体的条件和影响原生质体再生的因素。

材 料 和 方 法

(一) 菌种和培养基

金龟子绿僵菌短孢型变种 (*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*) 3305, 为贵州农学院植保系赠送。

PDA 培养基 用于菌种培养。

酵母膏培养基(含 0.5% 酵母膏, 1% 葡萄糖, 固体培养基加 2% 琼脂), 用于菌丝体培养。

察氏培养基, 用于原生质体再生培养。

(二) 试剂

溶菌酶和蜗牛酶, 中国科学院生物物理研究所生产。

纤维素酶, 中国科学院上海生物化学研究所生产。

真菌溶壁酶, 广东省微生物研究所提供。

FDA (fluorescein diacetate) 和 PI (propidium iodide), 美国加州大学赠送。

VBL 型荧光增白剂, 武汉化学助剂总厂生产。

(三) 原生质体的形成

1. 原生质体的制备: 用液体培养或固体上玻璃纸隔离培养^[5]获得的1克新鲜菌丝置于2ml裂解酶液中, 恒温培养, 同时缓慢振荡, 使酶液充分作用。酶解混合液用G2漏斗过滤, 除去菌丝碎片。滤液用渗透压稳定缓冲液离心(2000r/min, 10 min)洗涤二次, 重新悬浮备用。

2. 原生质体的检定: 用光学显微镜和电子显微镜观察原生质体的形态和结构。

用 FDA-PI 荧光双染色法检测原生质体活力^[10]。

结果与分析

(一) 金龟子绿僵菌原生质体的形成

1. 原生质体的观察和检定: 用相差显微镜和油镜观察, 原生质体呈球形(图1-1)。核染色后可看到原生质体含单核或无核。用电子显微镜观察, 可看到原生质体外层为双层膜结构, 内部的原生质物质高度浓缩, 证明了裸露的原生质体(图1-2)。

将原生质体进行 FDA-PI 荧光双染色后, 在荧光显微镜下观察到黄绿色荧光斑点和桔黄色荧光斑点(即有活力的和无活力的原生质体)大约各占一半, 说明有50%左右的原生质体已丧失活力。

2. 原生质体的形成条件

(1) 裂解酶系统的选择: 除溶菌酶外, 单独使用蜗牛酶、纤维素酶和真菌溶壁酶均能使菌丝释放出一定量的原生质体。其中以纤维素酶最佳, 每克湿菌丝体可获得 8.1×10^7 个原生质体/ml。真菌溶壁酶次之, 溶菌酶的作用很弱, 每克湿菌丝仅能得到 0.8×10^8 个原生质体/ml, 为纤维素酶的1%左右(表1)。在纤维素酶中

表1 不同种类的酶对绿僵菌原生质释放的影响

酶	纤维素酶	真菌溶壁酶	蜗牛酶	溶菌酶
原生质体数 (10^7 /ml)	8.1	1.0	0.28	0.08

表2 不同的酶及浓度组合对绿僵菌原生质体释放的影响

酶和酶浓度	纤维素酶			纤维素酶加蜗牛酶		
	0.5%	1%	1.5%	0.25%+0.25%	0.5%+0.5%	0.75%+0.75
原生质体数 (10^7 /ml)	2.0	7.0	4.8	2.2	8.7	8.6

表3 不同的渗透压稳定剂及其浓度对绿僵菌原生质体释放的影响

原生质体数 (10^7 /ml)	渗透压稳定剂	渗透压稳定剂浓度 (mol/L)			
		NaCl	KCl	NH ₄ Cl	甘露醇
0.4		4.6	3.1	6.1	
0.6		7.7	9.4	8.5	0.47
0.8		5.2	5.4	6.5	

表 4 不同菌龄对绿僵菌原生质体释放的影响

菌龄(小时)	16	24	36
原生质体数(10^7 /ml)	9.0	10.4	3.8

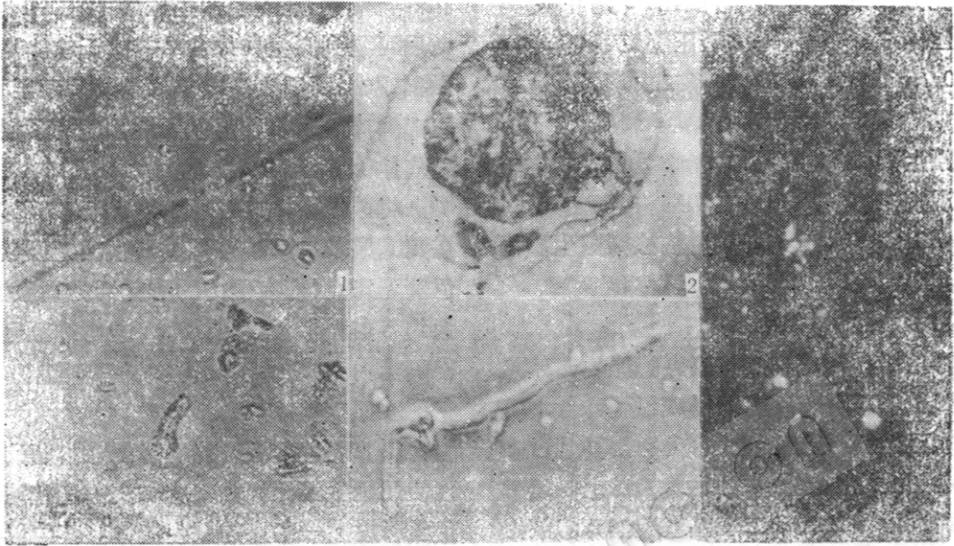


图 1 金龟子绿僵菌原生质体的观察及荧光染色

1.相差显微镜下的原生质体($\times 400$); 2.电子显微镜下的原生质体($\times 20000$); 3—4.原生质体的再生萌发($\times 400$); 5.VBL 荧光染色

加入适量的蜗牛酶能提高酶解效果。在只含纤维素酶或混有等量蜗牛酶的系统,均以酶浓度 1% 为适宜(表 2)。

(2) 渗透压稳定剂的选择: 在纤维素酶加蜗牛酶的系统, NaCl、KCl 和 NH_4Cl 三种无机盐渗透压稳定剂比甘露醇更利于原生质体释放,其中以 0.6mol/L KCl 作渗透压稳定剂时原生质体产量最高,达到 9.4×10^7 个/克湿菌丝体(表 3)。

(3) 菌丝体菌龄的选择: 用培养 16、24、36 小时的菌丝进行比较,表明菌龄为 24 小时的菌丝释放的原生质体数最多(表 4)。菌龄为 16 小时的菌丝也能释放较多的原生质体,甚至比 24 小时的菌丝更为迅速。

表 5 酶解温度对绿僵菌原生质体释放的影响

温度($^{\circ}\text{C}$)	25	30	33	37
原生质体数(10^7 /ml)	3.3	8.1	8.2	4.5

(4) 酶解温度、时间及 pH 值的选择: 温度对酶解作用有一定影响。试验表明,菌丝在 25—37 $^{\circ}\text{C}$ 之间都能释放一定量原生质体,但以 30—33 $^{\circ}\text{C}$ 产量最高(表 5)。从酶解时间上看,在一定范围内,原生质体数量随酶解时间增加而增加,3—4 小时达到高峰,随后逐步下降(表 6)。pH 值也是影响酶解作用的因素之一,当 pH 6.5 时,获得的原生质体产量最高,但 pH 6.0—7.0 间的影响并不明显(表 7)。

表 6 酶解时间对绿僵菌原生质体释放的影响

时间(h)	1	2	3	4	5
原生质体数(10^7 /ml)	1.2	3.3	7.0	7.2	5.2

综合以上试验结果,认为 0.5% 纤维素酶加 0.5% 蜗牛酶系统,以 0.6M KCl 作渗透压稳定剂, pH6.5 时,30 $^{\circ}\text{C}$ 下对菌龄为 24 小时的菌丝培养 3—4 小时,为制备绿僵菌原生质体的适宜条件。

表7 酶系统的 pH 值对绿僵菌原生质体释放的影响

pH	5.5	6.0	6.5	7.0
原生质体数 (10^7 /ml)	4.6	6.6	7.8	7.3

(二) 金龟子绿僵菌原生质体的再生

1. 原生质体的再生形态: 在液体培养基中培养 24 小时, 原生质体膨胀或无变化, 36—48 小时后, 可观察到少数原生质体从一端或两端长出芽管, 继续培养可长成正常菌丝(图 1-3, 4)。

2. 原生质体细胞壁再生的检测: 刚形成的原生质体经 VBL 型荧光增白剂染色后, 用荧光显微镜观察, 视野内一片黑暗, 没有荧光。而在液体培养基上培养 36 小时的原生质体则能被 VBL 型荧光增白剂染色, 荧光显微镜下可看到绿色荧光斑点(图 1-5), 证明有几丁质存在即细胞壁再生。

3. 影响原生质体再生的因素: 在含渗透压稳定剂的察氏培养基上, 部分原生质体能够恢复, 长出正常菌落, 再生率较低。分别用 NaCl、KCl、NH₄Cl、甘露醇和蔗糖作渗透压稳定剂进行试验, 再生率多为 0.1—1.2%。其中含蔗糖和 NH₄Cl 的培养基上, 再生率都在 0.3% 以下。用糖、醇作渗透压稳定剂比用无机盐 (NaCl、KCl 或 NH₄Cl) 的再生速度快, 前者经 48 小时培养后可在培养基上辨认出再生菌落, 而后者需培养 72 小时才能辨认。

原生质体在液体再生培养基中培养 24 小时后, 再转移到再生平皿上, 再生率可提高到 8% 以上。

讨 论

(一) 关于原生质体形成条件

要获得大量的、纯净的并且保持完整生理功能的原生质体, 关键在于选择适宜的裂解酶系统。许多研究者认为, 使用诱导微生物产生的酶复合体或混合使用商品酶比单独使用一种商品酶来制备原生质体更为有效^[5,8,11]。本实验用几种商品酶, 发现纤维素酶加蜗牛酶比单独

使用任何一种酶效果好。与前人工作结果一致。

培养方式可能会影响菌丝细胞壁的结构, 从而间接地影响菌丝对裂解酶的敏感性。本试验比较了液体培养和固体上玻璃纸隔离培养的菌丝对原生质体释放效果, 表明液体培养的菌丝能释放出更多的原生质体。作者认为, 尽管菌丝在液体中生长会形成菌丝球, 但菌丝的生长顶端暴露于球表面。由于丝状真菌原生质体从菌丝顶端“挤”出, 菌丝球并无碍于原生质体的释放。另外, 可能菌丝在液体中形成的细胞壁不如固体培养时暴露于空气的菌丝细胞壁那样牢固, 因而表现为对裂解酶作用较为敏感。此结果与一些研究者的结果正好相反^[4,5], 也许是由于不同种类的真菌细胞壁成分和结构的差异所造成。

(二) 关于原生质体再生

再生率低的原因, 起决定作用的是原生质体本身的修复能力。如果释放的原生质体细胞膜或细胞器严重损伤, 那么原生质体是残损的或已死亡, 不能恢复成正常细胞形态。本试验的 FDA-PI 检测说明了这一点。

渗透压稳定剂的作用是维持原生质体的渗透压平衡, 以免胀破失活。但渗透压稳定剂是否会加重原生质体的损伤或抑制细胞壁的再生值得注意。本试验以 NH₄Cl 作渗透压稳定剂时, 再生率很低, 甚至再生平皿上的菌落数比对照(用无菌水处理, 接种于不含 NH₄Cl 的培养基)还少, 这一现象也许与 NH₄Cl 破坏了细胞膜功能或抑制了细胞壁再生有关。

再生培养条件也非常重要。除培养基成分外, 培养方式也会影响再生率^[13]。本试验中, 原生质体先在液体培养基中培养 24 小时再转移到再生平皿上比直接接种到固体平皿上的再生率高, 可能是因为原生质体在液体中所受的压力比较均匀, 利于吸收周围营养合成细胞壁的缘故。

(三) 关于 FDA-PI 荧光双染色法

Huang 等用 FDA-PI 荧光双染色法来检测大麦糊粉层原生质体的活力^[10]。他指出, 在有生活力的原生质体中, 高活性的酯酶能将

FDA 分解释放出荧光素,而无生活力的原生质体不能分解 FDA。但 PI 只能穿过受伤的细胞膜进入无活力的原生质体中,与 DNA 或 RNA 结合。在蓝光激发光下,荧光素发黄绿色荧光,PI-核酸发桔黄色荧光。因此在同一视野中可一目了然地估计出有活力和无活力的原生质体的大致比例。此法方便易行,而且可靠。本试验证明 FDA-PI 也可用于绿僵菌原生质体的活力检测。

参 考 文 献

[1] 吕鸿声,钱纪放:昆虫病理学,浙江科学技术出版社,

杭州,81-108页,1982年。

[2] 刘颐屏,袁朝辉:微生物学报,24(2): 156-160, 1984。

[3] 汤建中等:抗生素,9(4): 293-300,1984。

[4] 陈漱溟,曹军卫:真菌学报,5(2): 117-123,1986。

[5] 梁平彦等:植物生理学报,7(1): 1-10,1981。

[6] 黄祥辉,颜季琼:植物生理学报,6(2): 207-211, 1980。

[7] 古屋武等:日本农芸化学会誌,57(1): 1-8,1983。

[8] Eysen, H.: *Agricultura*, 25: 21-44, 1977。

[9] Ferenczy, L. et al.: *Experientia*, 33: 184-186, 1977。

[10] Huang, C-N. et al.: *Protoplasma*, 135: 80-87, 1986。

[11] Musilkova, M. et al.: *Fol. Microbiol.*, 14: 47-50, 1969。

[12] Peberdy, J. F. et al.: *Mol. Gen. Genetic*, 157: 281-284, 1977。

[13] Yabuki, M. et al.: *Experimental Mycology*, 3: 386-390, 1984。