

小麦纹枯病菌原生质体制备条件及再生菌株致病性研究

张颖¹, 李黎¹, 许玉彬¹, 王少伟¹, 王刚^{1,2*}

(1. 河南大学 生命科学学院, 河南 开封 475004; 2. 河南大学 生物工程研究所, 河南 开封 475004)

摘要: 以小麦纹枯病菌 HD-6 为对象, 进行原生质体制备与再生研究, 并将再生菌株与原始菌株的致病性进行比较分析, 为建立小麦纹枯病菌高效遗传转化体系提供依据。选用溶壁酶、崩溃酶、蜗牛酶、纤维素酶 4 种常见酶分别对小麦纹枯病菌进行酶解, 并通过单因素试验分析酶解温度、酶解时间以及溶液 pH 值对原生质体得率的影响。结果表明, 4 种酶均能够裂解小麦纹枯病菌细胞壁得到一定数量的原生质体, 其中崩溃酶的裂解效果最好, 每克菌丝得到的原生质体数可达到 2.6×10^8 个。该酶的最佳反应温度是 24 °C, 最适的酶解时间是 3 h, 最适的 pH 值是 6.0。获得的原生质体可以完成再生, 并且再生菌株与原始菌株的致病力没有显著差异。

关键词: 小麦纹枯病菌; 原生质体; 再生菌株; 致病性

中图分类号: S435.121 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)08-0082-04

Protoplast Preparation Conditions of *Rhizoctonia cerealis* and Pathogenicity of Regenerated Strains

ZHANG Ying¹, LI Li¹, XU Yu-bin¹, WANG Shao-wei¹, WANG Gang^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China;

2. Institute of Bioengineering, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: *Rhizoctonia cerealis* strain HD-6 was used for studying the protoplast preparation and regeneration, and the pathogenicity of wild-type and regenerated strains was compared. Four lytic enzymes, lywallzyme, driselase, snailase and cellulose, were used for the protoplast preparation independently. The effects of enzymolysis temperature, enzymolysis time and solution pH on protoplast preparation were investigated according to the single factor tests. Among the four enzymes, the driselase had the best efficiency for protoplast preparation and the protoplast quantity per gram of mycelium reached 2.6×10^8 . The best conditions for the protoplast preparation were that the mycelium of *R. cerealis* was digested at 24 °C in driselase solution (pH 6.0) for 3 h. The prepared protoplasts could produce mycelium, which had the similar pathogenicity to that of the wild-type strain.

Key words: *Rhizoctonia cerealis*; protoplast; regenerated strain; pathogenicity

小麦纹枯病(wheat sharp eyespot)是由禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis*)侵染引起的一种严重的土传病害^[1]。该病是一种世界性病害,分布范围广泛,引起了人们的普遍重视^[2]。近年来,随着水肥条件的改善,纹枯病已成为我国小麦生产上的重要病害和高产稳产的主要限制性因素之一^[3-4]。目前,由

泛,引起了人们的普遍重视^[2]。近年来,随着水肥条件的改善,纹枯病已成为我国小麦生产上的重要病害和高产稳产的主要限制性因素之一^[3-4]。目前,由

收稿日期: 2014-01-20

基金项目: 河南大学校内科研基金项目(07YBGG011)

作者简介: 张颖(1979-),女,河南新乡人,实验师,硕士,主要从事资源微生物学研究。E-mail: zhangying03@henu.edu.cn

* 通讯作者: 王刚(1971-),男,河南夏邑人,教授,博士,主要从事资源微生物学研究。E-mail: wangg@henu.edu.cn

于缺乏有效的抗病品种,只能通过化学防治和辅助的农业措施控制该病害。这些传统的防治措施不仅造成环境污染,还可能使化学药剂残留在食品中,由此会带来一系列的社会和经济问题^[5]。长期利用化学防治还会使病原菌出现抗药性,导致防治成本大幅增加^[6]。通过建立小麦纹枯病菌高效遗传转化体系,构建病菌的突变体库,克隆致病相关基因,从分子水平探讨致病机制,是控制该病害的根本途径。致病菌原生质体的制备和再生是进行遗传转化的重要前提。目前对于真菌的原生质体制备和再生,国内外学者已有较多的研究,但不同的真菌,其细胞壁结构及组分不同,所以制备原生质体的最佳条件也存在差异^[7-10]。前人在禾谷丝核菌原生质体的制备及再生等方面已有文献报道^[11-14],但笔者按照这些方法制备小麦纹枯病菌的原生质体时,可能是由于菌株和试验条件的差异,其结果都不尽理想。为此,对小麦纹枯病菌原生质体制备的最佳条件进行探索,并对其再生菌株的致病能力进行研究,以期为该病原菌的遗传转化等研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

原始菌株:小麦纹枯病菌 HD-6 菌株从开封市北郊乡麦田发病的小麦植株中分离得到,在 4℃ 下保存于 PDA 斜面培养基上备用。

小麦品种:矮抗 58,购自开封市种子公司。

供试细胞壁裂解酶:溶壁酶购自广东微生物研究所;崩溃酶购自 Sigma 公司;蜗牛酶购自北京欣经科生物科技有限公司;纤维素酶购自 Serva 公司。

1.2 培养基

固体培养基:PDA 培养基;

液体培养基:PDB 培养基;

再生培养基:酵母提取物 0.5 g/L,酪素(酶水解) 0.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, KCl 441.0 g/L, KH_2PO_4 1.52 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, NaNO_3 4.0 g/L, 葡萄糖 10 g/L, pH 值 6.5^[15]。

1.3 小麦纹枯病菌原生质体的制备

1.3.1 酶液的配制 用 0.2 mol/L pH 值 7.0 的磷酸缓冲液配制 0.7 mol/L 的 NaCl 溶液,作为渗透压稳定剂配制各种酶液,酶液的质量浓度为 15 mg/mL。待酶液充分溶解后,10 000 r/min 离心 5

min,取上清液,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌,置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.3.2 小麦纹枯病菌菌丝体的制备 在铺有灭菌玻璃纸的 PDA 平板上接种小麦纹枯病菌,20℃ 下培养 7 d。用无菌镊子把菌丝从玻璃纸上轻轻刮下,置于加有少量 PDB 的无菌研钵中研磨,然后转入含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 100 mL PDB 培养基中,置 120 r/min、20℃ 摇床振荡培养 1 d,用 3 层无菌擦镜纸过滤,0.7 mol/L NaCl 冲洗,收集菌丝体备用。

1.3.3 原生质体的制备 称取菌丝体 0.1 g 置于加有 0.5 mL 酶解液的 20 mL 离心管中,在一定的温度(18~28℃)下以 100 r/min 的速度在摇床上振荡,酶解一定时间(1~4 h)后,用 0.7 mol/L NaCl 通过 3 层擦镜纸过滤冲洗,冰浴收集酶解滤液至 50 mL 离心管中,4℃、4 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,得到的沉淀即为原生质体。加入 200 μL 的 NaCl 溶液溶解原生质体。最后用血球计数板在显微镜下计数。

1.4 小麦纹枯病菌原生质体的再生

将得到的 200 μL 原生质体混悬液转移至 2 mL 的再生培养基中,23℃ 下培养 24 h 备用。微波炉融化固体再生培养基和 1% 的琼脂,置于 50℃ 水浴中保温。将 2 mL 液体培养的原生质体溶液倒在培养皿中,加入预热的固体再生培养基,在超净台上轻轻地充分振荡均匀,凝固后再将 1% 的琼脂倒在平板上作为上层,冷凝水干燥后加封口膜置于 23℃ 培养箱中培养 9 d。挑取单菌落接种在 PDA 培养基上继续培养,制备再生菌株进行致病性测试。

1.5 再生菌株致病力的检测

采用菌饼接种法对随机抽取的再生菌株 R1、R2、R3、R4、R5 进行致病性鉴定。用 1% 的次氯酸钠溶液浸泡小麦种子 10 min,无菌水冲洗数次后催芽待用。在塑料钵(15 cm×18 cm, D×H)中装入无菌砂土,用直径 1 cm 的无菌打孔器在平板上选取生长均匀的菌落打取菌饼,有菌的一面朝上置于砂土中,用无菌镊子将萌发的小麦芽端置于菌饼上,每个菌饼上放置 1 粒麦种,在其上覆盖一层无菌砂土,缓慢浇水 15 mL 并避免将麦粒从菌饼上冲掉,最后再覆盖一层无菌砂土。处理后置于 20℃ 下培养 20 d,每隔 1 d 用喷雾器喷水保湿 1 次。以原始菌株 R0 处理的麦种和培养基处理的麦种分别作为阳性对照和阴性对照(CK),每个处理设置 10 个重复,参照黄承彦等^[16]的分级标准统计小麦的发病情况。

2 结果与分析

2.1 小麦纹枯病菌原生质体的制备条件

2.1.1 不同细胞壁裂解酶的酶解效果比较 测定了溶壁酶、崩溃酶、蜗牛酶、纤维素酶 4 种常见酶对小麦纹枯病菌细胞壁的酶解能力,结果(图 1)表明,这 4 种酶液均可以裂解小麦纹枯病菌的细胞壁而得到原生质体,但以崩溃酶酶解效果最好,每克菌丝得到的原生质体数达到 2.6×10^8 个。溶壁酶次之,原生质体得率为 1.8×10^8 个/g。其余 2 种酶效果较差。

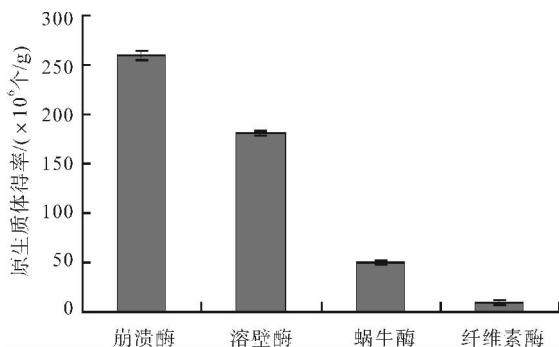


图 1 4 种酶制备原生质体的效果比较

2.1.2 酶解温度对酶解效果的影响 利用崩溃酶酶解小麦纹枯病菌 3 h 的试验结果显示,随着温度的提升,原生质体的得率逐步提高,当温度达到 24°C 时,该酶的活力最强,每克菌丝得到的原生质体数达到 2.7×10^8 个。当温度继续升高,原生质体的产量下降(图 2)。所以,利用崩溃酶酶解小麦纹枯病菌的最适温度是 24°C 。

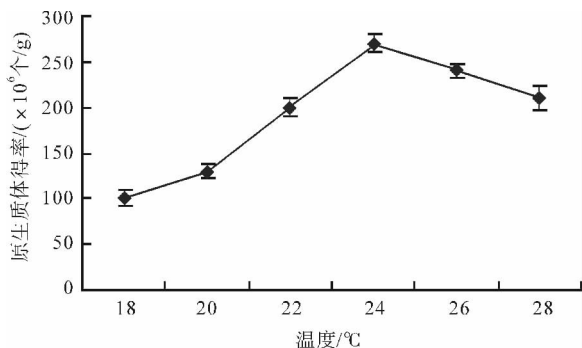


图 2 温度对酶解效果的影响

2.1.3 反应时间对酶解效果的影响 从图 3 可知,起初原生质体得率随着时间的延长逐渐升高,在 3 h 时达到高峰,为 2.45×10^8 个/g。之后随着时间继续增加原生质体得率反而下降(图 3)。所以,小麦纹枯病菌酶解的最佳时间是 3 h。

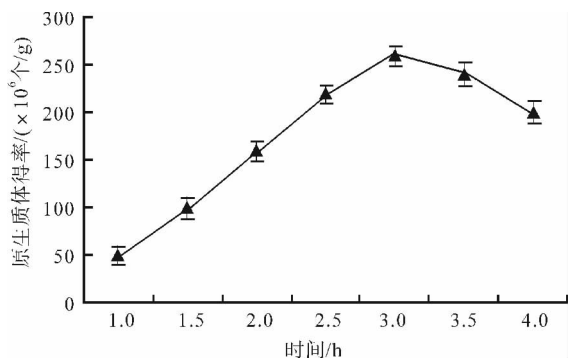


图 3 反应时间对酶解效果的影响

2.1.4 溶液 pH 值对酶解效果的影响 分别用 pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液配制 0.7 mol/L 的 NaCl 溶液,作为渗透压稳定剂配制质量浓度为 15 mg/mL 的崩溃酶。结果发现,随着 pH 值的增加原生质体得率逐渐升高,当 pH 值为 6.0 时,酶解得到的原生质体最多,为 2.7×10^8 个/g。而后随 pH 值升高,原生质体的产量逐步降低(图 4)。因此,本试验条件下制备原生质体最适 pH 值是 6.0。

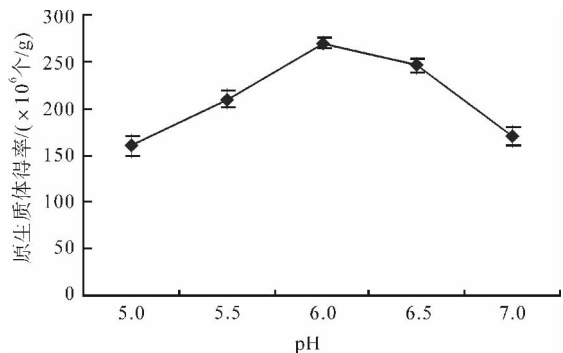


图 4 溶液 pH 值对酶解效果的影响

2.2 原生质体再生菌株的致病力

采用菌饼接种法测定了 5 个纹枯病菌原生质体再生菌株(R1—R5)对小麦的致病力,结果显示,它们的致病力与原始菌株(R0)相比没有显著差异(表 1)。

表 1 再生菌株对小麦的致病力测定结果

试验菌株	病情指数	发病率/%
R0	$25.6 \pm 0.24a$	100
R1	$24.9 \pm 0.16a$	100
R2	$26.3 \pm 0.19a$	100
R3	$25.8 \pm 0.29a$	100
R4	$27.1 \pm 0.42a$	100
R5	$25.0 \pm 0.23a$	100
CK	0	0

注:相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

小麦纹枯病的主要致病菌是禾谷丝核菌,该病原菌的细胞壁由蛋白质、几丁质、葡聚糖等多种成分组成。纤维素酶属于单一的酶类,对小麦纹枯病菌细胞壁的分解能力有限。蜗牛酶属于复合酶类,对病原微生物细胞壁的分解能力较纤维素酶强,但是也只是对细胞壁中葡聚糖含量较多的真菌如酵母菌的酶解效果好^[7],而对小麦纹枯病菌的酶解效果则相对较弱。这说明小麦纹枯病菌与酵母菌的细胞壁组分存在明显差异。溶壁酶属于另外一种复合酶,裂解子囊菌(如小麦全蚀菌)细胞壁的能力较强,对小麦纹枯病菌细胞壁的裂解效果一般。崩溃酶广泛应用于植物病原菌的原生质体制备^[17],对小麦纹枯病菌同样具有较好的裂解效果,可以获得较高得率的原生质体。本试验还研究了反应温度、时间和溶液 pH 值对小麦纹枯病菌原生质体得率的影响,明确了反应的最适条件。研究发现,酶解最适温度为 24℃,原因可能是由于小麦纹枯病属于一种低温病害,菌核形成的最适温度为 20~25℃,温度升高会影响菌丝的生长。酶解时间是影响原生质体得率的一个重要因素,不同真菌存在差异。孔丹丹等^[18]在水稻纹枯病菌原生质体制备中发现酶解 4~6 h 能够得到较高的原生质体得率。本研究发现,在酶解时间为 3 h 时获得的原生质体数量最多,随后产量下降,这可能是由于试验条件和酶种类的不同所致。在溶液 pH 值方面,不同真菌制备原生质体时的最适 pH 值略有区别^[8]。杨迎青等^[7]研究认为,制备水稻纹枯病菌原生质体的最适 pH 值是 5.6,而本试验结果显示,pH 值 6.0 最适合小麦纹枯病菌细胞壁酶解和原生质体释放。

小麦纹枯病菌与其他的一些丝状真菌相比,具有多核特性和遗传复杂性,造成其遗传转化存在不稳定性及较大的困难,导致该菌的致病机制和相关基因的探索明显滞后。原生质体的制备和再生是以原生质体为受体进行遗传转化的前提^[18-19]。因此,小麦纹枯病菌原生质体的制备,以及具有和原始菌株同样致病性的再生菌株的建立,将为以原生质体为转化受体的遗传转化提供重要基础,对开展小麦纹枯病菌的分子遗传学和功能基因组学研究及探索病害控制的新途径具有重要意义。

参考文献:

- [1] 檀根甲,季伯衡. 小麦纹枯病的研究进展[J]. 安徽农业学报,1998,25(1):70-75.
- [2] 张会云,陈荣振,冯国华. 中国小麦纹枯病的研究现状与展望[J]. 麦类作物学报,2007,27(6):1150-1153.
- [3] 陈健华,张炽昌,徐东方,等. 小麦纹枯病的研究进展[J]. 现代农业科技,2011(1):169-170.
- [4] 李丽琳,范晓东. 小麦纹枯病的发生及防治方法[J]. 天津农业科学,2009,15(4):90-92.
- [5] Chen Y, Yan F, Chai Y R, et al. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends in conserved genes mediating biofilm formation[J]. Environ Microbiol, 2013, 15: 848-864.
- [6] 任丽娟,陈佩度,陈怀谷,等. 小麦抗纹枯病种质资源筛选[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(1):108-111.
- [7] 杨迎青,李明海,杨媚,等. 水稻纹枯病菌原生质体制备与再生条件的优化[J]. 华中农业大学学报,2010,29(5):546-551.
- [8] 朱宏莉,宋纪蓉,张嘉,等. 果胶酶产生菌 ZH-g 的原生质体形成与再生研究[J]. 食品科学,2006,27(8):68-71.
- [9] 周庆新,陈静,于恺,等. 疏绵状嗜热丝孢菌原生质体的制备与再生[J]. 菌物研究,2006,4(2):1-5.
- [10] de Bekker C, Wiebenga A, Aguilar G, et al. An enzyme cocktail for efficient protoplast formation in *Aspergillus niger*[J]. J Microb Methods, 2009, 76: 305-306.
- [11] Feng H T, Sun Z G, Li H J, et al. Preparation, purification and regeneration optimizing research of protoplasts from *Rhizoctonia solani* [J]. African J Microb Res, 2012, 6(13): 3222-3230.
- [12] Liu T H, Lin M J, Ko W H. Factors affecting protoplast formation by *Rhizoctonia solani* [J]. New Biotech, 2010, 27(1): 64-69.
- [13] 李玲玲,于金凤. 小麦纹枯病菌细胞壁降解酶产酶条件的优化[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2011,42(3):329-334.
- [14] 宋爱环,李红叶,刘小红. 指状青霉(*Penicillium digitatum*)原生质体制备和再生条件[J]. 农业生物技术学报,2004,12(2):197-201.
- [15] 张颖,王刚,王美南. 小麦全蚀病菌原生质体制备的条件及再生菌株的致病性[J]. 微生物学杂志,2005,5(25):29-32.
- [16] 黄承彦,杨平平,楚秀生. 中国小麦育种研究进展[M]. 北京:中国农业出版社,1996:274-279.
- [17] Thon M R, Nuckles E M, Vaillancourt L J. Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola* [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2000, 13(12): 1356-1365.
- [18] 孔丹丹,阙亚伟,闫霞,等. 水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)原生质体制备与再生技术及优化[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2013,39(3):274-280.
- [19] Namiki F, Matsunaga M, Okuda M, et al. Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2001, 14(4): 580-584.