

禾谷镰孢菌原生质体的制备和再生研究

林玲,史建荣,陈怀谷,石志琦,王裕中

(江苏省农业科学院植物保护研究所,南京 210014)

[摘要] 为建立禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum* Schwabe)转化体系,选用禾谷镰孢菌株 F128 为受体,分别用裂解酶、蜗牛酶、崩溃酶、纤维素酶、几丁质酶消化该菌细胞壁,都可获得一定数量的原生质体,其中产生原生质体效率最高的是崩溃酶,而且以 5 g/L 浓度产生的原生质体数量最多,消化 3.5~4.5 h 即可获得相当数量的原生质体,菌量的加入以每毫升酶解液中加入 20 mg 湿菌丝产生的原生质体最多,所制备出的原生质体的再生方式至少有 2 种。

[关键词] 禾谷镰孢菌,原生质体制备,再生

[中图分类号] Q93-335; [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)01-0088-04

0 引言

对病原菌基因表达系统的研究是探讨植物病原菌的致病机制,寻求控制植物病害的有效途径^[1,2]。近年来对植物病原菌的遗传转化研究已取得较大进展,其中,有关病原菌原生质体的制备和再生技术是进行遗传转化的关键^[3]。禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum* Schwabe)是小麦赤霉病的病原菌,而小麦赤霉病是影响我国长江中下游、东北麦区以及世界其他温暖潮湿地区重要的灾变性病害。近年来,在欧美等国家小麦赤霉病发生严重,研究小麦赤霉病的致病机理以及病害防治已成为一个热点。现有的关于小麦赤霉病菌致病机理的报道还不多,为了进行禾谷镰孢菌致病性相关基因的研究,我们对禾谷镰孢菌原生质体的制备方法以及原生质体再生等方面进行了研究。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

禾谷镰孢菌株 F128,由江苏省农业科学院植物保护研究所保存。

1.2 培养基

产孢培养基:绿豆汤(4 g/L)。

液体培养基:Medium A,参考 Miller 等的方法^[4]。配方为葡萄糖 20 g/L, NH_4Cl 3 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, MgSO_4 2 g/L, peptone 2 g/L, yeast extract 2 g/L, malt extract 2 g/L。

再生培养基:PDA。

1.3 细胞壁消解酶液

溶菌酶 Lysozyme(上海 Promega 公司),崩溃酶 Driselase(Sigma 产品),蜗牛酶 Snailase(国

收稿日期 2000-09-07

基金项目 江苏省青年基金 BQ98017] 333 基金 863 项目 BH-02-03-01] 欧共体资助项目

作者简介 林玲,1973—,女,硕士,江苏省农科院植物保护研究所实习研究员,主要从事小麦病害致病机理与防治的研究。

产)纤维素酶(Serva 产品),几丁质酶(Sigma 产品).各酶均用 1 mol/L NH_4Cl 配制.

1.4 原生质体的制备步骤

主要根据 Wiebe 的方法^[5],并作适当修改,以下过程均在无菌条件下操作,除注明温度条件外,其它操作温度均为 4℃.挑取在 PDA 平板上生长的菌丝团,放入产孢培养基中,在旋转摇床上振荡培养 6 d (25℃, 180 r/min),然后转接分生孢子液至 Medium A 中,使起始接种浓度为 $10^3/\text{mL}$, 25℃, 120 r/min 培养 34 h 左右,真空抽滤收集菌丝,并用 1 mol/L NH_4Cl 洗 1 次,每毫升消化酶液加入 20 mg 湿菌丝,在摇床上振荡 3.5 h (28℃, 100 r/min).消化后的细胞悬浮液用双层擦镜纸过滤,滤去未消化的菌丝体.原生质体通过 5 000 r/min 离心 10 min 收集,再用 1 mol/L NH_4Cl 洗涤 2 次,最终将原生质体悬浮于 1 mol/L NH_4Cl 中,即得到可用于转化的原生质体.

1.5 原生质体的形态观察和计数

在光学显微镜($\times 400$)下观察,用血球计数板计数.

1.6 原生质体的再生观察

吸取 1~2 滴原生质体悬浮液涂布在再生培养基平板上,置于 25℃ 恒温培养,定时取出在光学显微镜($\times 400$)下观察其生长进度.

1.7 菌丝干重的测定

将真空抽滤过的菌丝,用 1 mol/L NH_4Cl 洗 1 次,置于烘箱中 80℃ 烘干 24 h.每个处理 3 个重复.

2 结果

2.1 原生质体的制备

2.1.1 不同酶类对原生质体形成的影响

单种酶类以崩溃酶的酶解效果最好,几丁质酶次之,溶菌酶最差,如图 1 所示.另外用蜗牛酶制备的原生质体中杂质较多,而用溶菌酶和纤维素酶制备的原生质体,大小不均一,有大量小的原生质体.崩溃酶所制备的原生质体不仅背景清晰而且大小均一.

2.1.2 酶反应时间对原生质体形成的影响

由图 2 可见,当 Driselase(5 g/L)处理时间达 3.5 h 后,即原生质体释放量达最高峰后趋于稳定.所以,要获得大量的原生质体,对禾谷镰孢菌 F128 而言,以酶反应 3.5~4.5 h 为宜.

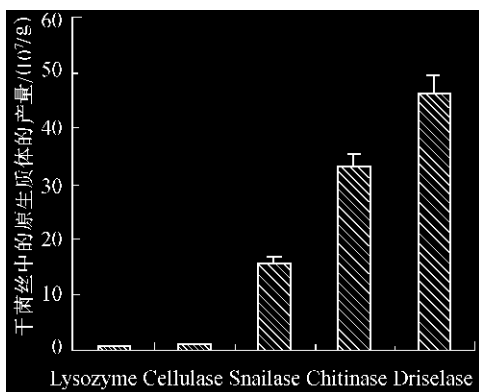


图 1 不同酶制备原生质体的效果

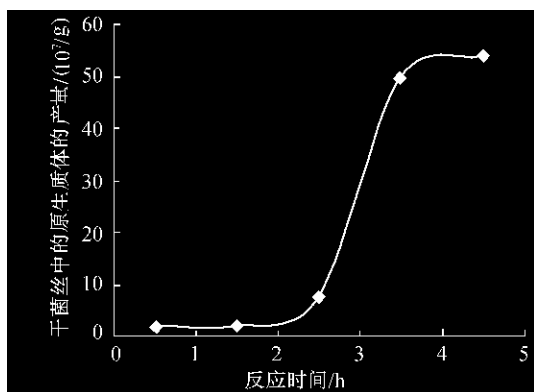


图 2 反应时间对原生质体制备的影响

2.1.3 酶浓度对原生质体形成的影响

由图 3 可见,在相同的实验条件(温度 28℃,反应时间 3.5 h)下,由 Driselase 处理后原生质体产量数据

体产生的数量随着酶浓度的增加而增多,当酶浓度为 5 g/L 时,产生原生质体数量达到最高值之后,酶浓度继续增加,所产生的原生质体数量几乎不再增长.所以,进行大量原生质体制备实验时,酶的浓度宜采用 5 g/L.

2.1.4 菌量对原生质体形成的影响

由图 4 可见,每毫升酶解液中加入 20 mg 湿菌丝时,所产生的原生质体最多,每毫升酶解液中湿菌丝量超过或小于 20 mg 时都使原生质体产生的数量减少.因此,每毫升酶解液中应选用 20 mg 湿菌丝以最大限度的获得 F128 的原生质体.

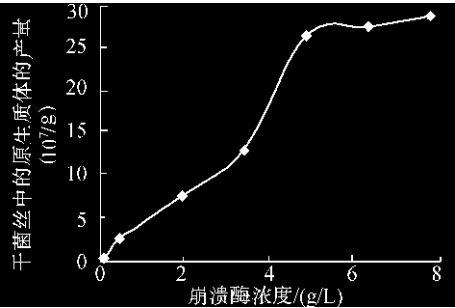


图 3 崩潰酶浓度对原生质体形成的影响

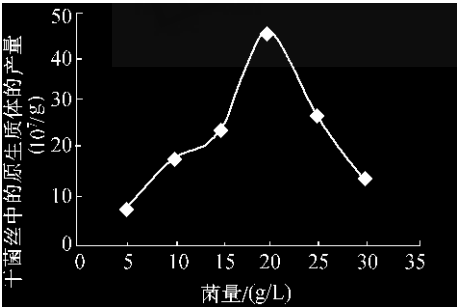
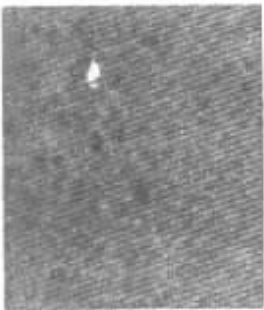


图 4 菌量对原生质体形成的影响

2.2 原生质体的再生方式观察

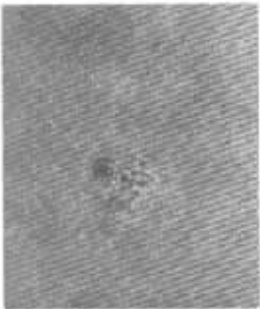
新制备的 F128 菌株的原生质体在再生培养基中萌发至少有 2 种方式,一种直接萌发出菌丝状的芽管,另一种为类似于芽殖酵母的分裂方式.芽管不断伸长,继而分枝,最终形成典型的树枝状形态,如图 5 所示.



A 用 Driselase 制备的 F128 菌株的原生质体



B 原生质体直接萌发出菌丝状的芽管



C 原生质体萌发以类似于芽殖酵母的分裂方式进行



D 由原生质体生长的典型的禾谷镰孢菌菌丝

图 5 禾谷镰孢菌原生质体及其发育状况(×400)

3 讨论

因真菌细胞壁由几丁质、糖原、蛋白质、半纤维素等多种成分构成,真菌在形成原生质体的过程中,真菌的细胞壁被细胞壁消解酶消解出一个个小孔,这样原生质体就从这些小孔中溢出到周围的等渗液中^[6]。裂解酶与纤维素酶消解细胞壁不完全,只能形成小的原生质体,而崩溃酶是一种复合酶,内含昆布多糖酶(laminarinase)、木聚糖酶(xylanase)和纤维素酶(cellulase),消解细胞壁的能力强,能完全降解禾谷镰孢菌 F128 的细胞壁,生成的原生质体大而均一。禾谷镰孢菌原生质体制备所需崩溃酶的浓度要比稻瘟病菌所用的高^[3],这可能与禾谷镰孢菌的细胞壁结构有关。本研究还明确了禾谷镰孢菌原生质体制备时所用酶的最适浓度、最适反应时间以及所用菌的量,所制备出的原生质体可在 4℃ 存活 1 周以上,为建立转化体系进行限制性内切酶诱导整合(Restriction Enzyme-Mediated Integration, REMI)及禾谷镰孢菌致病性相关基因的研究奠定了基础。

致谢:本所周益军、张文荟老师对本文给予的关心与帮助。

[参考文献]

- [1] 唐国敏.丝状真菌基因表达系统研究进展[J].真菌学报,1992,11(2):81—88.
- [2] 闫培生,罗信昌,周启.丝状真菌基因工程研究进展[J].生物工程进展,1999,19(1):36—41.
- [3] 周益军,范永坚,王金生,等.稻瘟病菌原生质体的制备和再生菌株的致病性[J].江苏农业学报,2000,16(2):83—87.
- [4] Miller J D, Greenhalgh R, Wang Y Z, et al. Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species[J]. Mycologia, 1991, 83(2): 121—130.
- [5] Wiebe M G, Novakova M, Miller L, et al. Protoplast production and transformation of morphological mutants of the Quorn^R myco-protein fungus *Fusarium graminearum* A3/5 using the hygromycin resistance plasmid Pan 7 - 1[J]. Micol Res, 1997, 10(7): 871—877.
- [6] Harris G M. Protoplasts from *Gibberella fujikuro*[J]. Phytopathology, 1982, 72: 1403—1407.

Preparation and Regeneration of Protoplasts for *Fusarium graminearum* Schwabe

Lin Ling, Shi Jianrong, Chen Huaigu, Shi zhiqi, Wang Yuzhong

(Institute of plant protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, PRC)

Abstract Strain F128 of *Fusarium graminearum* Schwabe was selected as recipient to develop the transformation system. Enough protoplasts were obtained by digestion of the fungal cell wall with lysozyme, cellulase, snailase, chitinase, driselase. Driselase had the highest efficiency among them. The most protoplasts were gained with 5 g/L for 3.5 ~ 4.5 hours at 20 mg wet weight mycelium/lytic mix. There were at least two different ways to start regeneration of protoplast.

Key words: *Fusarium graminearum* Schwabe; preparation of protoplasts; regeneration