

# 玉米大斑病菌原生质体的制备与再生\*

宋庆涛<sup>1</sup> 张国珍<sup>1\*\*</sup> 董金皋<sup>2</sup>

(中国农业大学植物病理学系 北京 100094)<sup>1</sup> (河北农业大学生命科学院 保定 071001)<sup>2</sup>

**摘要:**以玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum*) 0109-8 为供试菌株,研究了菌龄、液体培养基、酶系统、酶解时间、稳渗剂对玉米大斑病菌原生质体制备的影响及稳渗剂对原生质体再生的影响。结果表明制备玉米大斑病菌原生质体适宜的条件为: Fries 液体培养基培养分生孢子 24h, 1% Lywallzyme、1% Drislase 和 1% Snailase 3 种酶溶液混合使用, 酶解 5h, 0.7mol/L KCl 为稳渗剂; 原生质体再生以 0.6mol/L 蔗糖作为稳渗液为佳。

**关键词:** 玉米大斑病菌, 原生质体, 制备, 再生

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 02-0041-04

## PROTOPLAST PREPARATION AND REGENERATION OF *EXSEROHILUM TURCICUM*

SONG Qing-Tao<sup>1</sup> ZHANG Guo-Zhen<sup>1\*\*</sup> DONG Jin-Gao<sup>2</sup>

(Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100094)<sup>1</sup>

(College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071001)<sup>2</sup>

**Abstract:** The strain 0109-8 of *Exserohilum turcicum*, caused north leaf blight of maize, was used for studying the effect of the age of hyphae, liquid medium, enzyme system, time of digestion and stabilizer on the protoplast preparation and the effect of stabilizer on the protoplast's regeneration. The results indicated that the optimum condition for preparing protoplasts was: the conidia cultured in liquid Fries medium for 24 hours, enzyme mixture of 1% Lywallzyme, 1% Snailase and 1% Drislase used to digest the hyphae for 5 hours, 0.7mol/L KCl used as the osmotic stabilizer; 0.6mol/L sucrose as the osmotic stabilizer for the regeneration of protoplast.

**Key words:** *Exserohilum turcicum*, Protoplast, Preparation, Regeneration

玉米大斑病是玉米的重要病害之一。玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum*) 通过产生致病毒素而使玉米发病后产生典型大斑症状。近年来对植物病原菌的遗传转化研究已取得较大进展, 在许多植物病原菌中都已建立了遗传转化体系。其中, 有关病原菌原生质体的制备和再生是进行遗传转化的关键, 但目前尚未见有关玉米大斑病菌遗传转化方面的报道。为应用限制性内切酶介导的整合 (REMI) 技术对玉米大斑病菌的致病性相关基因进行研究, 本研究对该病菌原生质体制备和再生进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

玉米大斑病菌菌株 0109-8, 由河北农业大学生命科学院真菌毒素实验室提供。

### 1.2 培养基

**1.2.1 产孢培养基 (CM 培养基):** 酶水解干酪素 0.5g, 酸水解干酪素 0.5g, 酵母浸膏

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39970477)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39970477)

\*\* 联系人

收稿日期: 2002-04-04, 修回日期: 2002-05-23

1g, 蔗糖 10g, 琼脂 16g, pH 自然, 加水定容至 1L。

**1.2.2 液体培养基 (Fries 培养基):** 蔗糖 30g, 酒石酸胺 5g, NaCl 0.1g,  $\text{CaCl}_2$  0.1g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1g,  $\text{MgSO}_4$  0.5g, 酵母浸膏 0.5g, pH 自然, 加水定容至 1L。PD 培养基: 马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, pH 6.0, 加水定容至 1L。CM 培养基: 同上 (不含有琼脂)。

**1.2.3 再生培养基 (液体再生培养基):** 在 PD 培养基中加入稳渗剂, 使其终浓度为 0.6mol/L。(固体再生培养基): 按 18g 琼脂/L 的比例在液体再生培养基基础上加入琼脂。

### 1.3 试剂

**酶制剂:** 溶壁酶 (Lywallzyme 简称 L) (广东微生物研究所), 蜗牛酶 (Snailase 简称 S) (北京经科化学试剂公司), 崩溃酶 (Drislase 简称 D) (Sigma 公司), 纤维素酶 (Cellulase 简称 C) (北京经科化学试剂公司)。

**稳渗剂:** NaCl、KCl、蔗糖、山梨醇和甘露醇。

### 1.4 原生质体制备方法

参考玉米小斑病菌 (*Bipolaris maydis*) 原生质体制备方法<sup>[1]</sup>和粟长蠕孢菌 (*Helminthosporium setariae*) 原生质体制备方法<sup>[2]</sup>并做适当的修改。以下均在无菌的条件下操作。挑取玉米大斑病菌的保存菌种至 CM 产孢培养基上, 20℃, 黑暗培养 20d, 用无菌水洗下培养基表面的孢子, 将含分生孢子的滤液 (约  $10^6$  个分生孢子) 加入到含有 100mL 的 Fries 液体培养基的 500mL 三角瓶中, 静止培养 24h, 不时振荡。离心 (4,000 r/min, 10min) 收集菌丝, 用 0.7mol/L NaCl 冲洗 (约 0.5g 湿菌丝), 加入 3mL 混合酶液 (1%L + 1%D + 1%S + 1%C, 用 0.7mol/L NaCl 配制) 于 30℃ 水浴酶解, 不时振荡, 酶解 5h, 400 目不锈钢网过滤除去菌丝碎片, 离心 (3,000 r/min, 15min) 收集原生质体, 用 0.7mol/L NaCl 稳渗剂悬浮, 血球计数板记数。每次试验设 3 个重复, 每个重复测量 3 次, 求平均值。

**1.4.1 菌龄对原生质体制备的影响:** 供试菌株分生孢子培养时间分别为 18、24 和 30h, 其它操作同上。

**1.4.2 液体培养基对原生质体制备的影响:** 供试菌株的分生孢子于 PD、CM、Fries 培养基中培养, 其它操作同上。

**1.4.3 酶系统对原生质体制备的影响:** 采用 1%L + 1%C、1%L + 1%D、1%L + 1%S、1%L + 1%D + 1%S、1%L + 1%D + 1%S + 1%C 几种酶组合制备原生质体, 其它操作同上。

**1.4.4 酶解时间对原生质体制备的影响:** 菌丝于酶溶液中分别酶解 1、2、3、4、5 和 7h, 其它操作同上。

**1.4.5 稳渗剂对原生质体制备的影响:** 用浓度均为 0.7mol/L 的 NaCl、KCl、蔗糖、山梨醇和甘露醇分别配制酶溶液, 进行酶解试验, 洗涤菌丝时所用的稳渗剂和酶溶液中稳渗剂保持一致, 最后也悬浮在相同的稳渗液中, 其它操作同上。

### 1.5 原生质体的纯化

在原生质体大部分释放于酶溶液中后, 先以 400 目不锈钢网过滤去除残余菌丝片段, 再以 0.7mol/L 稳渗剂经 6 层擦镜纸过滤清洗, 重复过滤 4 次。将滤液离心 (3,000 r/min 15min), 收集原生质体。原生质体重新悬浮于 0.7mol/L 稳渗剂中。

### 1.6 原生质体的再生

将纯化后的原生质体适当稀释放于 3mL 液体再生培养基中, 使原生质体数达到  $10^4$  个, 静止培养 12h, 与 17mL 热融并冷却至 45℃ 的固体再生培养基中混合, 并迅速轻轻摇动, 使原生质体均匀分布于培养基中。待凝固后, 封口, 25℃ 倒置培养 3d, 对形成的菌落记数 (A), 以不含稳渗剂再生培养基作对照 (B)。每次试验设 3 个重复, 求平均值。计算再生率。再生率公式: 再生率 (%) = (A-B) × 100/总原生质体数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 原生质体制备

**2.1.1 菌龄对原生质体制备的影响:** 试验结果表明在一定的时间内, 随着培养时间的延长原生质体数量增加, 18h 原生质体数量为  $1.08 \times 10^6$  个, 24h 原生质体的产量达到最高, 为  $2.74 \times 10^6$  个, 但 30h 原生质体的数量却迅速下降, 仅为  $5 \times 10^5$  个。由此可见, 酶的作用受菌龄的影响较大, 幼嫩的菌丝有利于酶的作用, 但菌龄过短, 酶解时原生质体容易破裂; 若菌丝培养时间过长, 不利于原生质体的释放, 原因可能是随着菌龄的增加, 菌丝体细胞壁的成分发生了一些变化。

**2.1.2 液体培养基对原生质体制备的影响:** 试验结果 (表 1) 显示, 在供试的 3 种培养基中, Fries 培养基比其它两种培养基更有利于原生质体的制备, 原因可能是由于培养基成分不同, 对菌丝细胞壁的一些微细结构有不同的影响, 从而影响了原生质体的释放。

表 1 菌丝培养基对原生质体制备的影响

液体培养基	原生质体数 ( $\times 10^5$ )
PD	0.56
CM	9.0
Fries	19.2

**2.1.3 酶系统对原生质体制备的影响:** 由于丝状真菌的细胞壁组分较为复杂, 主要由几丁质, 1,3-β-D 葡聚糖, 1,6-β 葡聚糖, 脂类, 糖蛋白<sup>[3]</sup>组成, 因此要获得较多的原生质体, 选择适宜的裂解酶系统非常重要。使用微生物产生的酶复合体或者商品酶混合液比单独使用一种酶液效果好<sup>[4]</sup>。

本试验以 Lywallzyme (溶壁酶) 为基本酶, 与其它 3 种酶进行组合, 从中选择最佳的酶系统。2 次试验的结果均显示, 4 种酶混用以及溶壁酶。崩溃酶和蜗牛酶 3 种酶混用效果均明显好于其它组合 (表 2)。因此, 选用溶壁酶。崩溃酶和蜗牛酶 3 种酶混用制备玉米大斑病菌原生质体。

表 2 酶系统对原生质体制备的影响

酶系统	原生质体数 ( $\times 10^6$ )	
	1	2
1%L+1%C	0.01	0.01
1%L+1%D	0.01	0.01
1%L+1%S	0.81	0.75
1%L+1%D+1%S	2.96	2.85
1%L+1%D+1%S+1%C	2.98	2.90

**2.1.4 酶解时间对原生质体制备的影响:** 试验结果显示, 酶解时间从 1~5h, 随着酶解时间的延长, 原生质体数量在逐渐增加, 5h 达到  $2.32 \times 10^6$ , 7h 后开始减少 (图 1)。因此合适的酶解时间为 5h, 可见在一定的时间内, 延长酶解时间, 原生质体的数量增加, 但超过一定时间后, 原生质体的数量反而会降低, 其原因可能是由于酶混合液中含有一些蛋白酶, 酶解时间过长会对一些早期释放的原生质体膜有破坏作用, 从而影响了原生质体膜的稳定性, 导致原生质体活力降低甚至破裂<sup>[5]</sup>。

**2.1.5 稳渗剂对原生质体制备的影响:** 试验结果 (图 2) 表明: 在以 0.7mol/L KCl 和

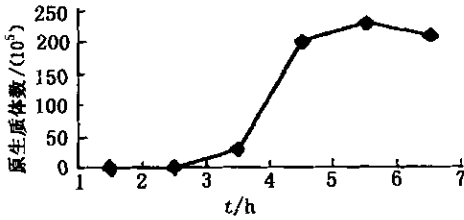


图1 酶解时间对原生质体制备的影响

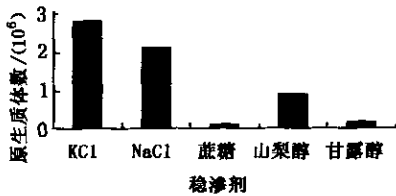


图2 稳渗剂对原生质体制备的影响

这种情况在其它真菌也有报道<sup>[6]</sup>。

### 2.3 原生质体的再生

两次试验的结果均显示在以 0.6mol/L 蔗糖和山梨醇为稳渗剂的再生培养基上, 玉米大斑病菌的原生质体再生率较高, 而在以 0.6mol/L NaCl 和 KCl 为稳渗剂的再生培养基上, 玉米大斑病菌的原生质体再生率较低 (表 3)。

表3 稳渗剂对原生质体再生的影响

稳渗剂	再生率 (%)	
	1	2
NaCl	0.106	0.106
KCl	0.113	0.097
甘露醇	0.12	0.13
山梨醇	5.61	5.34
蔗糖	7.53	8.13

NaCl 为稳渗剂的混合酶液中, 原生质体的释放量较高, 以 0.7mol/L 的蔗糖为稳渗剂混合酶液不利于原生质体的释放。

### 2.2 原生质体的纯化

原生质体的纯化一般使用离心分离、滤器过滤等方法。由于本研究使用的菌株, 其原生质体直径为 17.955 $\mu$ m ~ 20.52 $\mu$ m, 菌丝的平均宽度为 7.70 $\mu$ m, 分生孢子的平均宽度为 20.52 $\mu$ m, 因此用 400 目的钢网虽然可以将大部分菌丝截留在钢网上, 但是只用这些滤器要完全去除菌丝体及细胞壁的微细片段是困难的。尽管经过多层擦镜纸、多次过滤可以获得纯净的原生质体, 但在此过程中也会损失很多原生质体, 因此其进一步纯化还有待于探索,

由于丝状真菌的细胞壁组成较为复杂, 而且不同真菌的细胞壁组成也存在差异, 因此要获得大量的、活力较高的原生质体, 选择适宜的制备条件很重要。通过以上试验, 确立了玉米大斑病菌的原生质体制备和再生较为优化的条件, 为今后的遗传转化工作奠定了基础。

**致谢** 本试验主要在中国农业大学分子植物病理学实验室完成并得到彭友良教授的大力支持, 特此致谢。

### 参考文献

- [1] Yoder O C. Advance in Plant Pathology, 1988, 6: 93 ~ 111.
- [2] Clude P S. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 2883 ~ 2894.
- [3] 郭 慧. 微生物学杂志, 1992, 12 (1): 39 ~ 40.
- [4] 陈 瀚, 曹军卫. 真菌学报, 1986, 5 (2): 117 ~ 123.
- [5] 朱宝成, 王俊刚, 成亚利, 等. 微生物学通报, 1994, 21 (1): 15 ~ 18.
- [6] 王 锴, 李 燕. 浙江工业大学学报, 1996, 24 (2): 160 ~ 165.