

实验方法与技术

Experimental Method & Technology

小麦矮腥黑粉菌原生质体的制备与再生

沈慧敏, 李超, 高利*, 刘太国, 刘博, 陈万权

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 本文优化了小麦矮腥黑粉菌原生质体的制备与再生条件。结果表明:小麦矮腥黑粉菌的冬孢子在土壤浸提液固体培养基中萌发后转接入 T19 液体培养基, 培养 45 d, 以菌丝作为酶解初始材料, 用 1.5% 崩溃酶+1.5% 溶壁酶+1.5% 蜗牛酶复合酶液 28℃ 酶解 2.5 h 原生质体的获得率最高; 以 1.2 mol/L 的氯化钾为渗透压稳定剂, 所得原生质体数量最多, 且释放的原生质体能均匀分散分布, 不聚集成堆; 小麦矮腥黑粉菌的原生质体在 TB3 培养基上能长出较多的单菌落。

关键词 小麦矮腥黑粉菌; 原生质体; 制备; 再生

中图分类号: S 435.121 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017239

Protoplast preparation and regeneration of *Tilletia controversa*

SHEN Huimin, LI Chao, GAO Li, LIU Taiguo, LIU Bo, CHEN Wanquan

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract Protoplast is the receptor cells for genetic transformation of fungi. To establish protoplast-mediated genetic transformation system of *Tilletia controversa*, conditions for the protoplast isolation and regeneration of *T. controversa* were optimized, including incubation time, various enzymes, digestion time and osmotic stabilizers. The results showed that *T. controversa* teliospores cultured in soil extract medium for 45 days and then transferred into T19 medium were most suitable for protoplast release. The mixture solution of 1.5% driselase, 1.5% lyase and 1.5% snailase was most favorable for protoplast preparation. The suitable incubation time with enzyme for the maximum release of protoplasts was 2.5 h at 28℃. The most effective osmotic stabilizer for the protoplast release was 1.2 mol/L KCl, and protoplast was also well dispersed. For the regeneration of the protoplast, TB3 medium was the best, which can produce more single colony under the same condition.

Key words *Tilletia controversa*; protoplast; preparation; regeneration

小麦矮腥黑穗病 (wheat dwarf bunt disease, DB) 是由小麦矮腥黑粉菌 *Tilletia controversa* Kühn (TCK) 引起的重要国际检疫性病害^[1], 是麦类黑穗病中危害最大、极难防治的检疫性病害之一, 可对小麦生产造成毁灭性危害。小麦矮腥黑粉菌也是我国外来生物入侵研究的主要物种之一。感病植株通常矮化、多分蘖, 麦粒内含黑色、有鱼腥味的冬孢子^[2]。国内外对于小麦矮腥黑穗病的研究主要集中在病原菌的鉴定、生物学特性及分子检测技术等方面^[3-8], 而对该病原菌的遗传转化研究较少。遗传转

化技术是实现大规模定点突变的重要方法, 利用该技术能够使真菌的遗传物质发生改变, 研究植物病原菌的致病机理。目前, 进行真菌遗传转化的方法很多, 常见的有聚乙二醇介导的原生质体转化、限制性内切酶介导的整合以及农杆菌转化等^[9-11]。原生质体的制备和再生直接关系到转化能否顺利进行。小麦矮腥黑粉菌生长缓慢, 其原生质体制备较难成功, 目前还未有小麦矮腥黑粉菌原生质体制备成功的报道。本试验采用酶解细胞壁的方法制备了小麦矮腥黑粉菌原生质体, 研究了原生质体制备和再生

收稿日期: 2017-06-23 修订日期: 2017-09-26

基金项目: 国家自然科学基金(31571965)

* 通信作者 E-mail: lgao@ippcaas.cn

的适宜条件,以期能稳定快速地制备小麦矮腥黑粉菌原生质体,为建立该病原菌的遗传转化体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

小麦矮腥黑粉菌菌株,由中国农业科学院植物保护研究所麦类真菌病害研究组保存并提供。

1.2 培养基

2%土壤浸提液培养基:称取 75 g 灭菌土壤加 500 mL 沸水过滤后,加入 20 g 琼脂粉,蒸馏水定容至 1 L。

T19 培养基:称取磷酸二氢钾 613 mg,七水硫酸镁 246 mg,磷酸氢二钾 114 mg,氯化钙 55.5 mg,螯合铁 20 mg,七水硫酸锌 3.52 mg,五水硫酸铜 0.38 mg,硫酸镁 0.31 mg,二水钼酸钠 0.025 mg,氯化硫胺素 5 mg, L-天冬酰胺 3 mg,蔗糖 20 mg,蒸馏水定容至 1 L。固体培养基中加入 20 g 琼脂粉。

马铃薯葡萄糖固体培养基(PDA):称取 PDA 粉末(购自北京奥博星生物技术有限公司)37 g,蒸馏水定容至 1 L。

TB3 培养基:酵母提取物 3 g,酸水解酪蛋白 3 g,蔗糖 200 g,酵母粉 10 g,蒸馏水定容至 1 L。

以上培养基均经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min 后使用。

1.3 常用试剂

溶壁酶(lysing enzyme)、崩溃酶(driselase)购自 Sigma 公司,蜗牛酶(snailase)购自上海生化所,硫酸镁、氯化钾、山梨醇、蔗糖以及 T19 培养基中的试剂均为国产分析纯。

1.4 试验方法

1.4.1 小麦矮腥黑粉菌原生质体的制备

本试验采用酶解细胞壁法制备小麦矮腥黑粉菌的原生质体。用土壤浸提液培养基培养小麦矮腥黑粉菌冬孢子。用灭菌蒸馏水冲洗萌发的冬孢子转入 T19 液体培养基中,在恒温振荡器中 5℃、150 r/min 振荡培养。离心收集菌丝,取 1 g 加入到不同组合的复合酶液中,28℃、180 r/min 振荡酶解。每隔 30 min,用血球计数板观察原生质体,计算获得率。设置菌丝培养时间、裂解酶系统、酶解时间、渗透压稳定剂以及适合再生的培养基等试验参数,优化原生质体制备体系。

1.4.2 菌丝培养时间对小麦矮腥黑粉菌原生质体制备的影响

将在土壤浸提液培养基上萌发的小麦矮腥黑粉菌冬孢子转接到 T19 液体培养基中振荡培养 40、45、50、55、60 d,然后加入用 1.2 mol/L 氯化钾配制的酶液(1.5%崩溃酶+1.5%蜗牛酶+1.5%溶壁酶),酶解 3 h 后观察原生质体获得率,选出最适宜制备小麦矮腥黑粉菌原生质体的菌龄。

1.4.3 细胞壁裂解酶对小麦矮腥黑粉菌原生质体制备的影响

用 1.2 mol/L 氯化钾分别配制 1.5%崩溃酶、1.5%溶壁酶和 1.5%蜗牛酶,将酶液加入到培养 45 d 的菌丝中,28℃、180 r/min 振荡培养,3 h 后计算原生质体获得率,研究单一酶和不同组合的酶对小麦矮腥黑粉菌原生质体产量的影响。

1.4.4 酶解时间对小麦矮腥黑粉菌原生质体制备的影响

将配制好的酶液(1.5%崩溃酶+1.5%蜗牛酶+1.5%溶壁酶)加入到培养 45 d 的菌丝中,28℃、180 r/min 振荡培养,设置酶解时间分别为 1、1.5、2、2.5、3 h,显微镜检观察是否获得原生质体以及原生质体的数量。

1.4.5 渗透压稳定剂对小麦矮腥黑粉菌原生质体制备的影响

分别选择 1.2 mol/L 硫酸镁、氯化钾、山梨醇、蔗糖作为渗透压稳定剂,以 1.5%崩溃酶、1.5%溶壁酶和 1.5%蜗牛酶为细胞壁裂解酶,28℃、180 r/min 振荡培养,酶解 2.5 h,观察不同渗透压稳定剂对小麦矮腥黑粉菌原生质体制备的影响。

1.4.6 小麦矮腥黑粉菌原生质体的再生

以 1.5%崩溃酶、1.5%溶壁酶和 1.5%蜗牛酶为细胞壁裂解酶,以 1.2 mol/L 氯化钾为渗透压稳定剂,28℃、180 r/min 振荡酶解培养 45 d 的菌丝,将酶解 2.5 h 后所得原生质体配制成浓度为 1×10^5 个/mL,取 200 μ L 涂布在 PDA 和 TB3 平板上,5℃培养箱中培养,观察长出的单菌落。

1.5 数据处理

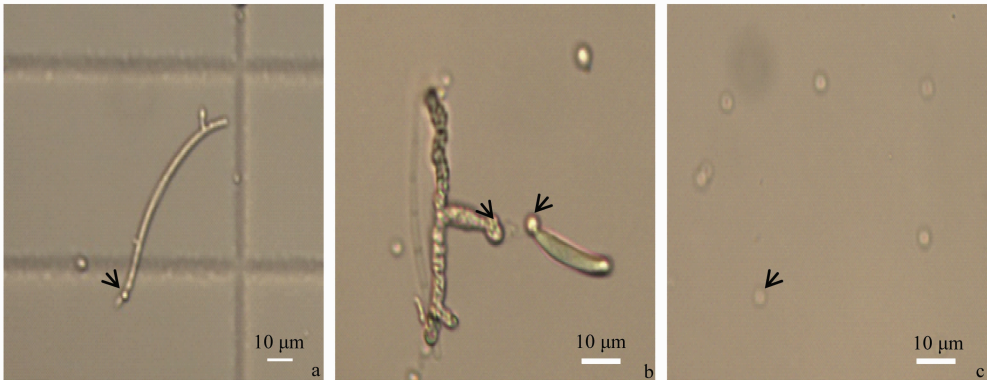
使用 Excel 对所得数据进行处理,制作柱形图和散点图。利用 DPS 软件将不同裂解酶种类下所得到的原生质体数量进行 LSD 多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 原生质体的释放过程

在酶解初始阶段,菌丝在裂解酶的作用下开始向内凹陷,呈节状断裂(图 1a)。薄弱的细胞壁比较容易

壁比较薄弱的位置释放。显微镜下观察可知,多数小麦矮腥黑粉菌的原生质体从菌丝的顶端开始释放(图 1b)。随着酶解进行,细胞壁逐渐被完全酶解,原生质体没有细胞壁的束缚,在释放后呈圆形透明的小球。小麦矮腥黑粉菌在酶解 2.5 h 后,大部分原生质体从菌丝上释放出来(图 1c)。



a: 菌丝的细胞壁在酶的作用下向内凹陷,呈念珠状,即将释放出原生质体,箭头所示为酶解处; b: 原生质体从菌丝的顶端开始释放,箭头所示为正在释放的原生质体,即将从菌丝中脱落下来; c: 大量释放出的原生质体,为圆形透明的小球
a: The cell wall of the hyphae is depressed to bead-like by the action of the lysozyme, and the protoplasts will be released immediately, the arrow show the place of depression; b: Protoplasts begin to release from the top of the mycelium, and the arrow shows the protoplasts being released, which are about to fall off the mycelium; c: A large number of protoplasts released in a circular transparent state

图 1 小麦矮腥黑粉菌原生质体的释放
Fig. 1 Protoplast release of *Tilletia controversa*

2.2 菌龄对原生质体获得率的影响

试验结果表明,在相同处理条件下,随着培养天数的增加,原生质体的数量呈先增后减的状态,在菌龄为 45 d 时原生质体数量达到最多,为 12.0×10^5 个/mL(图 2)。若培养时间较短或较长,均不利于原生质体的大量生成。

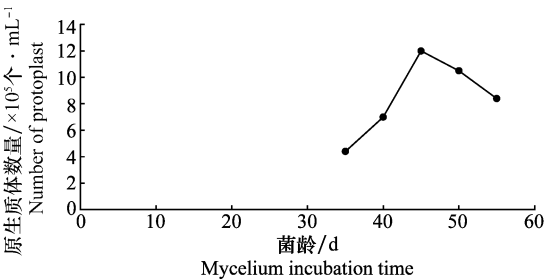


图 2 菌龄对小麦矮腥黑粉菌原生质体形成的影响
Fig. 2 Influences of mycelium incubation time on the preparation of the protoplast

2.3 裂解酶系统对原生质体获得率的影响

原生质体的产量受细胞壁裂解酶的种类和浓度的影响较大,且混合酶的作用效率高于单一酶。在单一酶作用时,1.5%崩溃酶所得小麦矮腥黑粉菌的原生质体数量最多,为 3.0×10^5 个/mL;1.5%溶壁

酶所得原生质体数量最少,为 2.4×10^5 个/mL;两种酶混合时,原生质体的数量比单一酶有所提高;三种酶混合时,得到的原生质体数量最多,为 11.5×10^5 个/mL(表 1)。因此,在小麦矮腥黑粉菌原生质体的制备中,选择崩溃酶、溶壁酶和蜗牛酶三种酶混合使用效果较好。

表 1 不同裂解酶组合对小麦矮腥黑粉菌原生质体数量的影响¹⁾

Table 1 Influences of different commercial enzyme combinations on the protoplast release of *Tilletia controversa*

裂解酶 Commercial enzyme	原生质体产量/ $\times 10^5$ 个·mL ⁻¹ Yield of protoplast
1.5% 崩溃酶 1.5% driselase	(3.0±0.12)e
1.5% 溶壁酶 1.5% lysing enzyme	(2.4±0.09)f
1.5% 蜗牛酶 1.5% snailase	(2.6±0.11)ef
1.5% 崩溃酶+1.5% 溶壁酶	(6.3±0.14)c
1.5% driselase+1.5% lysing enzyme	
1.5% 崩溃酶+1.5% 蜗牛酶	(7.8±0.21)b
1.5% driselase+1.5% snailase	
1.5% 蜗牛酶+1.5% 溶壁酶	(5.6±0.13)d
1.5% snailase+1.5% lysing enzyme	
1.5% 崩溃酶+1.5% 蜗牛酶+1.5% 溶壁酶	(11.5±0.22)a
1.5% driselase+1.5% lysing enzyme+1.5% snailase	

1) 不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。
Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

2.4 酶解时间对原生质体获得率的影响

采用 1.5%崩溃酶+1.5%溶壁酶+1.5%蜗牛酶为酶解系统,酶解 3 h,每隔 0.5 h 观察原生质体的数量。结果表明:原生质体数量随着酶解时间的增加而先增后减,酶解 2.5 h 时原生质体的数量达到最大值,为 9.5×10^5 个/mL。

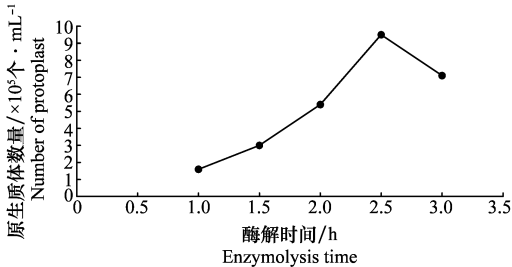


图 3 不同酶解时间对小麦矮腥黑粉菌原生质体产量的影响

Fig. 3 Effects of enzymolysis time on the protoplast yield of *Tilletia controversa*

2.5 渗透压稳定剂对原生质体获得率的影响

不同类型的渗透压稳定剂对产生原生质体制备的影响不同(图 4)。相同条件下,所选的 4 种渗透压稳定剂中无机溶剂比有机溶剂的原生质体获得率

更高,且以山梨醇和蔗糖作为渗透压稳定剂所得原生质体易聚集(图 5);以氯化钾为渗透压稳定剂时所得原生质体数量最多,为 10.8×10^5 个/mL。

2.6 原生质体再生

小麦矮腥黑粉菌原生质体在 PDA 和 TB3 培养基上的再生情况不同(图 6)。在 TB3 培养基中 5℃ 培养 2 周后长出单菌落,而在 PDA 上无单菌落长出,说明 TB3 培养基能够再生出小麦矮腥黑粉菌,可用于小麦矮腥黑粉菌原生质体的再生培养。

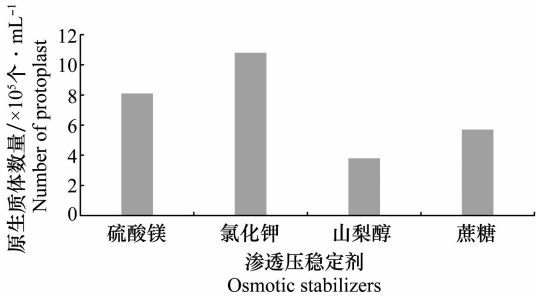
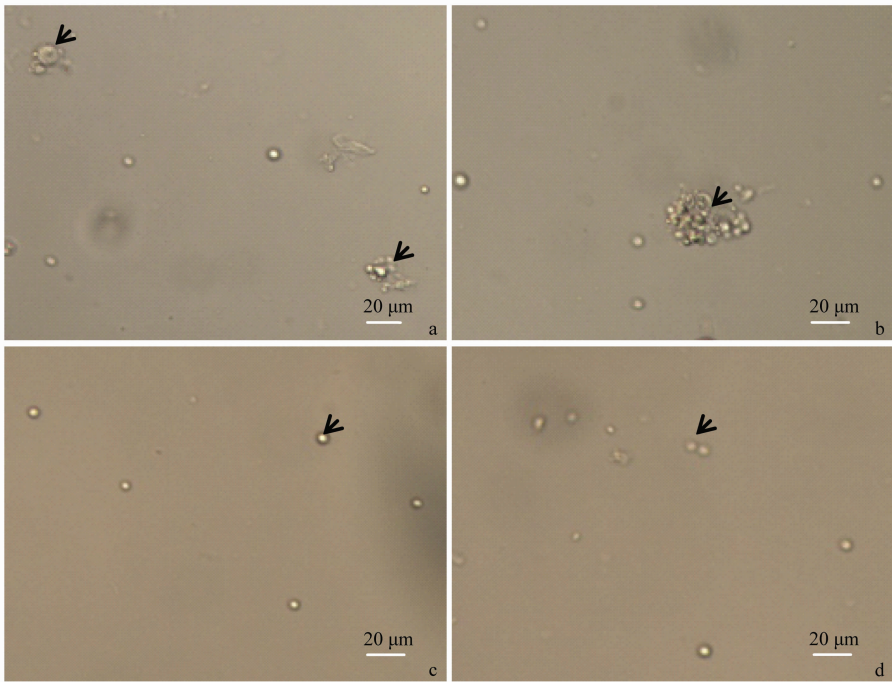


图 4 不同渗透压稳定剂对小麦矮腥黑粉菌原生质体产量的影响

Fig. 4 Effects of different osmotic stabilizers on the protoplast yield of *Tilletia controversa*



a: 以山梨醇作为渗透压稳定剂释放的原生质体发生聚集现象,箭头所示为聚集的原生质体; b: 以蔗糖作为渗透压稳定剂,原生质体聚集现象更严重,箭头所示为聚集成堆的原生质体; c: 以硫酸镁为渗透压稳定剂,原生质体呈分散状态,箭头所示为分散的原生质体; d: 以氯化钾为渗透压稳定剂时所得原生质体,箭头所示为释放的原生质体

a: Protoplast preparation with *D*-sorbitol as the osmotic pressure stabilizer, the arrow shows the aggregated protoplast; b: The osmotic pressure stabilizer is sucrose, the arrow shows the accumulation of piles of protoplast; c: The osmotic stabilizer is $MgSO_4$, and the protoplasts are dispersed, the arrow shows dispersed protoplast; d: The osmotic stabilizer is KCl, the arrows indicate the protoplast

图 5 小麦矮腥黑粉菌原生质体在 4 种渗透压稳定剂中的状态

Fig. 5 Protoplast state of *Tilletia controversa* in four kinds of osmotic stabilizers

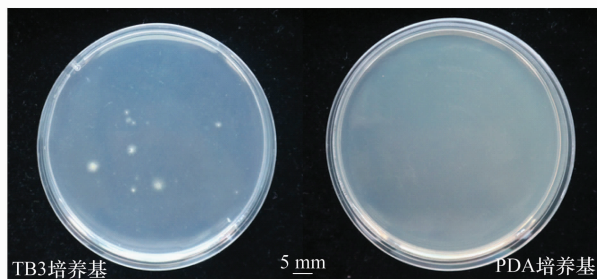


图6 小麦矮腥黑粉菌原生质体的再生

Fig. 6 Regeneration of protoplast of *Tilletia controversa*

3 讨论

本文优化了小麦矮腥黑粉菌原生质体制备的条件,确定了制备原生质体的最适宜条件:小麦矮腥黑粉菌冬孢子在土壤浸提液培养基上萌发后转接至T19液体培养基,以培养45 d的菌丝作为原生质体制备的初始材料,采用1.5%崩溃酶+1.5%溶壁酶+1.5%蜗牛酶酶解2.5 h,以1.2 mol/L氯化钾为渗透压稳定剂,以TB3为再生培养基。

研究发现在小麦矮腥黑粉菌原生质体制备中,原生质体的数量随着酶解的进行先增后减,在2.5 h时原生质体数量达到最大值,若继续酶解,原生质体数量将减少,而且酶解时间过长会造成原生质体破裂^[12-13]。真菌细胞壁成分复杂多样,单一酶的裂解效果较差,在小麦矮腥黑粉菌的原生质体制备中,选取3种酶混合时,原生质体获得率较高,这与周礼红等人^[14]的研究结果一致。本研究中,原生质体的制备中以无机溶剂作为渗透压稳定剂的效果比有机溶剂好,且得到的原生质体分散分布,这与玉米丝轴黑穗菌原生质体制备的结果有差异^[15]。

制备真菌原生质体一般都采用新鲜的组织^[16]。小麦矮腥黑粉菌的冬孢子需先在固体培养基中萌发,再将萌发长出的菌丝转移到液体培养基中培养,才能获得较多菌丝。小麦矮腥黑粉菌生长较慢,培养所用的时间较长,一般在固体培养基中萌发所需要的时间为30~35 d,因此,在固体培养基或液体培养基中培养45 d的菌丝属于较幼嫩菌丝,比较适合破壁。小麦矮腥黑粉菌冬孢子萌发后先产生先菌丝和初生担孢子,之后亲和性初生担孢子异宗配合,成对结合成“H”型,并产生侵染菌丝^[17],侵染菌丝易被酶解。如果培养时间过长,菌丝的细胞壁老化,成分改变,裂解酶系统对其作用不显著,原生质体的获得率较低^[18]。在小麦矮腥黑粉菌的原生质体的制备中,应该综合考虑各方面的因素,优化原生质体的

制备方法,以期建立小麦矮腥黑粉菌的遗传转化体系奠定基础。

参考文献

- [1] HOFFMANN J A. Bunt of wheat [J]. Plant Disease, 1982, 66 (11): 979 - 986.
- [2] 周益林,段霞瑜,贾文明,等. 小麦矮腥黑穗病(TCK)传入中国及其定殖的风险分析研究进展[J]. 植物保护, 2007, 33(2): 6 - 10.
- [3] 梁再群,郭翼奋,朱颖初,等. 根据统计分析冬孢子形态特性区分小麦矮腥黑穗病和网腥黑穗病的方法[J]. 植物保护学报, 1982, 9(4): 243 - 250.
- [4] TYLER L J, JENSEN N F. Some factors that influence development of dwarf bunt in winter wheat [J]. Phytopathology, 1958, 44(10): 565 - 571.
- [5] 王吉霞,周益林,段霞瑜,等. 温度对小麦矮腥黑穗病菌冬孢子萌发的影响[J]. 植物保护, 2006, 32(1): 38 - 40.
- [6] MCDONALD J G, WONG E, WHITE G P. Differentiation of *Tilletia* species by rep-PCR genomic fingerprinting [J]. Plant Disease, 2000, 84(10): 112 - 125.
- [7] 梁宏,张国珍,陈万权,等. 小麦矮腥黑穗菌与其近缘种的 rDNA-ITS 序列分析[J]. 植物病理学报, 2005, 35(S1): 181 - 183.
- [8] 梁宏,彭友良,张国珍,等. 腥黑粉菌属 3 种检疫性真菌 rDNA-IGS 区的扩增及其序列分析[J]. 植物病理学报, 2006, 36(5): 407 - 412.
- [9] HINNEN A, HICKS J B, FINK G R. Transformation of yeast [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981, 75(4): 1929 - 1933.
- [10] BÖLKER M, BÖHNERT H U, BRAUN K H, et al. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI) [J]. Molecular and General Genetics, 1995, 248(5): 547 - 552.
- [11] SCHIESTL R H, PETES T D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(17): 7585 - 7589.
- [12] 王赓,杜连祥. 新月弯孢霉原生质体制备及再生条件的研究[J]. 微生物学通报, 1999, 26(1): 21 - 23.
- [13] 杨岩,庞家智,陈新民. 小麦腥黑穗病和黑粉病[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1999.
- [14] 周礼红,李国琴,王正祥,等. 红曲霉原生质体的制备、再生及其遗传转化系统[J]. 遗传, 2005, 27(3): 423 - 428.
- [15] 宁平. PEG 介导的玉米丝轴黑粉菌原生质体转化与 ras、gpd 启动子的克隆[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [16] 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.
- [17] 蔚慧欣. 小麦矮腥黑粉菌分子检测体系的建立及侵染循环的观察[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2012.
- [18] 宋庆涛,张国珍,董金皋. 玉米大斑病菌原生质体的制备与再生[J]. 微生物学通报, 2003, 30(2): 41 - 44.

(责任编辑: 杨明丽)