

柑橘褐斑病菌原生质体制备与再生条件的优化

Optimization of protoplast preparation and regeneration conditions of *Alternaria alternata*

孔向雯 唐飞艳 吕韦玮 张倩 唐科志*

(西南大学柑桔研究所/中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

Kong Xiangwen Tang Feiyan Lü Weiwei Zhang Qian Tang Kezhi*

(Citrus Research Institute, Southwest University/Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

交链格孢菌 *Alternaria alternata* 是一种死体营养型真菌,可侵入宽皮柑橘及其杂交种,引起柑橘褐斑病,该病害可在柑橘整个生长期中发生,引起落叶落果,导致柑橘大幅减产,严重影响柑橘的产量和品质。柑橘褐斑病菌的主要致病因子为 ACT 毒素,ACT 毒素可引起细胞死亡,也会诱导寄主快速的发生过敏性坏死反应(Kazuya et al., 2014)。为更深入地揭示其致病机理,本试验以柑橘褐斑病菌菌株 Z7 为试验材料,从菌龄、裂解酶、酶解时间、稳渗剂等方面对该菌原生质体的制备及再生条件进行研究,旨在建立适合于柑橘褐斑病菌的原生质体高效遗传转化体系,以期为该病菌的深入研究提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:柑橘褐斑病菌菌株 Z7,由浙江大学李红叶教授惠赠,保存于国家柑桔苗木脱毒中心实验室。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水定容至 1 L;马铃薯葡萄糖(potato dextrose broth, PDB)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水定容至 1 L;TB₃培养基:蔗糖 200 g、酵母提取物 3 g、酪蛋白氨基酸 3 g、琼脂 7.5 g,蒸馏水定容至 1 L。

试剂及仪器:崩溃酶、蜗牛酶、溶壁酶、葡聚糖酶、纤维素酶,美国 Sigma 公司;Kitalase,日本和光纯药工业株式会社;其它试剂均为国产分析纯。ZXJPA1230 智能培养箱,上海智城分析仪器制造有限公司;BX43/CX23 生物显微镜,日本 Olympus 公司。

1.2 方法

柑橘褐斑病菌原生质体制备:称取 0.2 g 裂解酶

于 20 mL 稳渗剂中充分溶解后,过滤至经 PDB 摇瓶培养的菌丝中,于 30℃、100 r/min 进行酶解;细菌过滤器过滤酶解液,离心弃上清液;10 mL 稳渗剂悬浮沉淀,3 000 r/min 离心收集菌丝体;1×STC 悬浮沉淀 10 mL,离心收集菌丝体;将得到的原生质体溶于 1 mL 1×STC,显微镜下血球计数板观察计算原生质体个数。3 次重复。

柑橘褐斑病菌原生质体制备条件的优化:菌龄优化:供试菌株在 PDB 培养基中分别摇培 24、36、48 h;酶浓度及配比优化:预试验对 5 种浓度均为 1% 的单一酶——崩溃酶、蜗牛酶、溶壁酶、葡聚糖酶和纤维素酶作用下的原生质体释放量进行比较,结果显示在常规单种酶作用下柑橘褐斑病菌新鲜菌丝并不能释放出足量原生质体,其产量仅为 $10^5 \sim 10^6$ 个/mL,因此本试验设置了浓度为 1% 和 0.5% Kitalase 单一酶,同时还设置了不同配比的混合酶液,即 1% 崩溃酶+1% 蜗牛酶+1% 溶壁酶+1% 葡聚糖酶、0.5% Kitalase+1% 崩溃酶+1% 葡聚糖酶;酶解时间优化:菌丝在酶溶液中分别酶解 1、1.5、2、2.5、3 和 4 h;稳渗剂种类优化:用浓度均为 0.7 mol/L 的 NaCl、KCl 以及蔗糖稳渗剂分别配制酶溶液,洗涤菌丝。

柑橘褐斑病菌原生质体再生培养基的筛选:用稳渗剂调原生质体浓度至 1×10^5 个/mL,在 TB₃ 和 PDA 再生培养基上分别涂布 0.1 mL 的原生质体溶液;同时在 1×10^5 个/mL 浓度的原生质体溶液中加入 1 mL 无菌水,室温静置 30 min,涂布到 TB₃ 和 PDA 再生培养基上为对照。将再生培养基置于 28℃ 培养箱中培养 3 d,观察计数平板表面生长的菌落数。原生质体再生率=(固体培养基上小菌落数量-对照小菌落数量)/原生质体数量×100%。

1.3 数据分析

利用SPSS 19.0 软件进行数据统计分析,采用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 柑橘褐斑病菌原生质体制备条件的优化

在PDB培养基中培养36 h后,柑橘褐斑病菌原生质体释放量最多,达 4.17×10^8 个/mL,48 h时菌丝老化,酶解困难,产量减少,但仍与36 h时差异不显著(图1-A)。1% Kitalase作用下柑橘褐斑病菌原生质体释放量最大,为 3.95×10^8 个/mL,显著高于0.5%

Kitalase(3.05×10^8 个/mL)和1%崩溃酶+1%葡聚糖酶+1%溶壁酶+1%蜗牛酶的混合酶溶液(5.40×10^7 个/mL)($P < 0.05$,图1-B)。柑橘褐斑病菌原生质体释放量随酶解时间延长呈先增加后降低的趋势,当酶解时间为2.5 h时,原生质体释放量最高,平均为 4.55×10^8 个/mL,显著高于其它时间($P < 0.05$),酶解时间为4 h时仅为 2.8×10^8 个/mL(图1-C)。当稳渗剂为NaCl时,柑橘褐斑病菌原生质体释放量最多,达 4.72×10^8 个/mL,当稳渗剂为蔗糖时,不利于菌丝释放原生质体,仅为 0.5×10^8 个/mL。

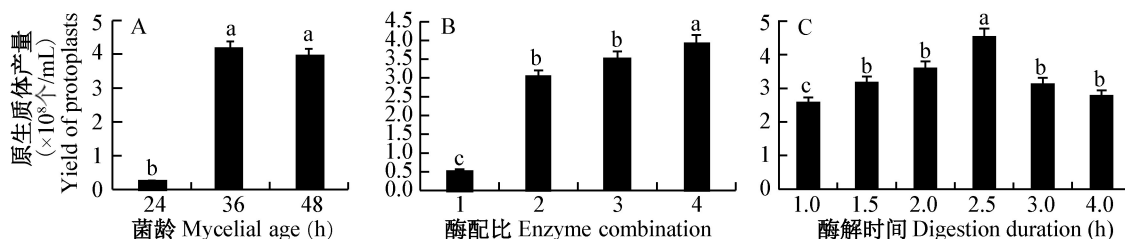


图1 菌龄(A)、酶配比(B)和酶解时间(C)对柑橘褐斑病菌原生质体释放量的影响

Fig. 1 Effects of mycelial age (A), enzyme combinations (B) and digestion duration (C) on protoplast yield of *Alternaria alternata*

图B中1~4: 1%崩溃酶+1%葡聚糖酶+1%溶壁酶+1%蜗牛酶、0.5% Kitalase、0.5% Kitalase+1%崩溃酶+1%葡聚糖酶、1% Kitalase。图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。1~4 in Fig. B: 1% driselase+1% dextranase+1% lyase+1% snailase, 0.5% Kitalase, 0.5% Kitalase+1% driselase+1% dextranase, 1% Kitalase. Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.2 柑橘褐斑病菌原生质体再生培养基的筛选

柑橘褐斑病菌原生质体在PDA培养基上的再生率只有4.33%,而在TB₃培养基上的再生率可达14.7%,两者之间差异显著(图2)。表明TB₃培养基更利于柑橘褐斑病菌原生质体的再生。

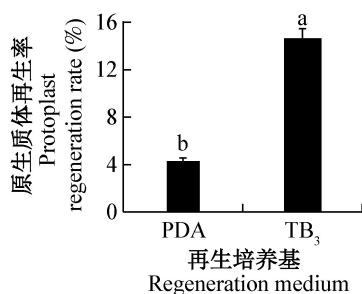


图2 不同再生培养基对柑橘褐斑病菌原生质体再生率的影响

Fig. 2 Effects of different regeneration media on the protoplast regeneration rate of *Alternaria alternata*

图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

丝状真菌细胞壁结构复杂,不同的丝状真菌菌体结构存在差异(张岳平等,2014),因此原生质体制

备方法也不同。在制备原生质体的酶解过程中,最关键的是选择合适的裂解酶,本研究结果表明,单独使用Kitalase时,柑橘褐斑病菌原生质体得率明显高于常规裂解酶,这与Cho et al.(2006)研究结果一致。合适的稳渗剂对获得高产、高质的原生质体至关重要,本研究结果表明0.7 mol/L NaCl可作为制备柑橘褐斑病菌原生质体的理想稳渗剂。下一步将利用优化的原生质体对不同基因进行遗传转化研究。

参考文献 (References)

- Cho Y, Davis JW, Kim KH, Wang J, Sun QH, Cramer RA Jr, Lawrence CB. 2006. A high throughput targeted gene disruption method for *Alternaria brassicicola* functional genomics using linear minimal element (LME) constructs. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(1): 7-15
- Kazuya A. 2014. *Alternaria* host-selective toxins: determinant factors of plant disease. *Journal of General Plant Pathology*, 80(2): 109-122
- Zhang YP, Luo SC, Huang YP, Yang YP, Yi KX, Xie BY, Chen GY. 2014. Isolation and regeneration of *Phomopsis asparagi* protoplast. *Journal of Plant Protection*, 41(2): 182-186 (in Chinese) [张岳平, 罗绍春, 黄燕萍, 汤泳萍, 易克贤, 谢丙炎, 陈光宇. 2014. 芦笋茎枯病菌原生质体的制备及再生. *植物保护学报*, 41(2): 182-186]

(责任编辑:张俊芳)