

重寄生链霉菌 F46 与生防放线菌 SC11 融合菌株的筛选

刘冰, 宗兆锋, 王记侠

(西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 利用重寄生链霉菌 F46 和生防放线菌 SC11 进行原生质体融合, 通过菌落形态特征及颜色的差异分离获得 8 株融合菌株。皿内实验结果表明, 包括 F-S5, F-S8, F-S12, F-S15 和 F-S16 在内的 5 个菌株保留了亲本 SC11 较强的抑菌作用, 其中 F-S8 只对粉红聚端孢(*Trichothecium roseum*)有较强的抑菌活性, 抑菌率>60%; F-S12 对粉红聚端孢(*T. roseum*)和大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)有抑菌作用, 抑菌率接近 60%; 而其他 3 个菌株对 5 种靶标病原真菌皆有强的抑菌活性, 抑菌率可达 70% 左右。在受抑菌丝再生能力测定中发现, 菌株 F-S15 对粉红聚端孢(*T. roseum*)有永久抑菌作用; 菌株 F-S5 对胶胞炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)以及菌株 F-S15 对大丽轮枝菌(*V. dahliae*)的永久抑菌作用比较显著。显微观察发现, 受融合菌株抑制的菌丝均有不同程度的畸变。

[关键词] 重寄生链霉菌 F46; 放线菌 SC11; 原生质体融合; 融合子

[中图分类号] Q939.13⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)03-0093-05

在植物病害生物防治过程中, 首先必须从自然界获得比较有效的野生菌株。但在长期的生物进化过程中这些野生菌株已经形成了一整套独特的代谢控制机制, 正常条件下不会过量生产超过其自身生长、代谢需要的酶或代谢产物, 这在很大程度上影响了利用其控制病害的效果。为了提高生防菌株的防病效果, 必须对野生菌株进行人工改良, 人为地把野生菌株生物合成的代谢途径朝人们所希望的方向加以引导, 或者促使细胞内发生基因的重新组合, 以优化遗传性状, 获得所需要的优秀菌种^[1]。西北农林科技大学病害生物防治实验室在多年病害生物防治研究中, 已经分离筛选出 10 多种具有生防作用的放线菌, 它们各自具有不同的作用机理。本研究利用原生质体融合的方法, 将具有重寄生作用的菌株 F46^[2-3]和具有较强拮抗作用的菌株 SC11 进行融合, 研究了融合子的筛选方法及其某些性状, 以期得到具有更好生防效果的工程放线菌, 为植物病害的生物防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 原生质体融合

1.1.1 原生质体制备

各加入 25 mL 培养液, 分别加入重寄生链霉菌菌株 F46 和生防放线菌菌株 SC11 孢子悬液 0.2 mL, 在 28℃ 条件下, 150 r/min 振荡培养 96 h。将培养物倒入无菌离心管中, 离心收集菌丝体。将菌丝体重新悬浮于缓冲液中, 重复上一步骤。随后将菌丝体悬浮于溶菌酶缓冲液中, 32℃ 条件下温浴以产生原生质体。补加 5 mL 磷酸缓冲液, 进行差速离心以除去未溶解菌丝。将上清液转入离心管中 3 000 r/min 离心 10 min, 沉淀原生质体。最后, 将原生质体悬于 5 mL 磷酸缓冲液中^[4-7]备用。

1.1.2 原生质体灭活 将制备的原生质体分为 3 份, 1 份在 60℃ 条件下进行热灭活, 1 份进行紫外灭活^[4,7], 1 份不做任何处理。

1.1.3 原生质体融合与再生 将上述处理过的双亲原生质体悬液两两混合, 3 000 r/min 离心 10 min, 温和沉降原生质体, 加入磷酸缓冲液 5 mL, 重复上述步骤, 除去残留在管底的液滴。再加入 1 mL 45% 的 PEG 6000, 立即用玻璃滴管吹吸以悬浮原生质体。置 37℃ 中温浴 3 min, 补加磷酸缓冲液中止反应后离心, 弃去上清液, 将重新悬浮的原生质体涂布于再生平板上, 30℃ 恒温培养 5~6 d, 使其再生^[4,7]。

[收稿日期] 2005-07-13

[基金项目] 国家“863”计划项目(2002AA24-5121); 教育部“春晖计划”启动基金项目(2002-317); 西北农林科技大学创新团队项目

[作者简介] 刘冰(1979—), 女, 陕西西安人, 在读硕士, 主要从事植物病害生物防治研究。

[通讯作者] 宗兆锋(1956—), 男, 陕西泾阳人, 教授, 主要从事植物病害生物防治研究。

1.2 融合子的获得

在再生培养基上初选与出发菌株形态不同的菌落作为融合子,将这些融合菌株和双亲菌株同时进行 6 次继代培养^[8],选出性状稳定的融合子用于抑菌作用测定。

1.3 皿内抑菌作用的测定

选择灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、胶胞炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum* f. sp. *niveum*)、粉红聚端孢(*Trichothecium roseum*)和大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*) 5 种常见的靶标病原真菌,采用平板对峙法测定 5 株融合菌株的皿内抑菌作用,镜检观察受抑制菌丝的形态变化,同时还测定了受抑制靶标病原真菌菌丝的再生能力^[9]。

2 结果与分析

2.1 融合子的获得

通过多次重复实验发现,双亲菌株原生质体的制备比较困难,融合频率也不高,但仍然有不同性状的菌株再生。依据出现菌落的形态和颜色,从再生平板上共分离获得 8 株再生菌株,将其菌落特征与亲本进行比较,结果见表 1。由于参加融合的 2 个亲本菌株 F46 和 SC11 的原生质体经灭活后失去了再生能力,而获得的再生菌株与双亲在菌落形态和颜色上明显不同,可以初步认为获得的再生菌株是融合子,对于这些融合子的进一步确定还有待于进行 DNA 分析。

表 1 融合菌株与亲本菌株菌落特征比较
Table 1 Colony character of the parents and the recombinants

菌株 Strains	菌落形态 Colony character	气生菌丝颜色 Colony colour	基内菌丝颜色 Pigment in media	产孢量 Production spores
F46	菌落呈辐射状 Radiate	淡红灰色 Little red and gray	珠母灰色 Gray like bead	++++
SC11	菌落呈圆形,中间突起 Round with central salience	白色 White	白色 White	++
F-S3	菌落呈圆形,中间平坦 Round without central salience	白色 White	白色或桔橙色 White or orange	++
F-S5	菌落呈圆形,中间平坦 Round without central salience	金黄色 Yellow like goden	桔橙色 Orange	+++
F-S6	菌落呈圆形,边缘不规则 Round with abnormity	白色 White	白色 White	+++
F-S8	菌落呈圆形,中间平坦 Round without central salience	淡紫色 Little purple	扁豆紫色 Purple like haricot bean	++
F-S10	菌落呈辐射状 Radiate	白色 White	金鸛黄色 Yellow like goden bird	++++
F-S12	菌落呈圆形,中间平坦 Round without central salience	象牙黄色 Yellow like ivory	茉莉黄色 Yellow like jasmine	+++
F-S15	菌落呈圆形,中间平坦 Round without central salience	白色偶带桔橙色 White with orange	桔橙色 Orange	+
F-S16	菌落呈圆形,中间平坦 Round without central salience	白色 White	白色,部分橙色或黄色 White, orange or yellow	+

注: + 表示产孢量的多少。

Note: Quantity of producing spores was indicated by +.

为了考察所获得融合子的稳定性,将其和 2 个亲本同时进行 6 次继代培养,最终选出了性状稳定的融合菌株 F-S5、F-S8、F-S12、F-S15 和 F-S16。

2.2 皿内抑菌效果

采用平板对峙法测定了 5 株融合菌株及其亲本对靶标病原真菌的抑菌效果,结果见表 2。由表 2 可见,选出的 5 株融合子对 5 种靶标病原真菌均有不同程度的抑制作用,其中 F-S8 只对粉红聚端孢有较

强的抑菌活性(抑菌率 > 60%); F-S12 对粉红聚端孢和大丽轮枝菌有抑菌作用,抑菌率接近 60%; 而 F-S5、F-S15 和 F-S16 对 5 种靶标病原真菌皆有强的抑菌活性(除 F-S15 对粉红聚端孢抑菌率接近 70% 外,其余均大于 70%)。与亲本进行比较,5 株融合菌株的抑菌活性大都介于 F46 和 SC11 之间,这可能是由于融合菌株继承了亲本重组后的遗传物质。

表 2 融合菌株及其亲本对 5 种靶标病原真菌的血内抑菌作用

Table 2 Inhibiting effects of the parents and the recombinants on five target pathogens

靶标病原真菌 Target pathogens	对照菌落 半径/mm CK colony radii	F46		SC11		F-S5		F-S8		F-S12		F-S15		F-S16	
		处理菌落 半径/mm Colony radii	抑菌率/% Inhibiting ratio	处理菌落 半径/mm Colony radii	抑菌率/% Inhibiting ratio	处理菌落 半径/mm Colony radii	抑菌率/% Inhibiting ratio	处理菌落 半径/mm Colony radii	抑菌率/% Inhibiting ratio	处理菌落 半径/mm Colony radii	抑菌率/% Inhibiting ratio	处理菌落 半径/mm Colony radii	抑菌率/% Inhibiting ratio	处理菌落 半径/mm Colony radii	抑菌率/% Inhibiting ratio
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	23.0	15.5	32.6	5.0	78.3	5.8	75.8	13.0	43.5	20.0	13.0	4.8	79.1	4.0	82.6
粉红聚端孢 <i>T. roseum</i>	18.0	15.5	13.9	4.8	73.3	4.8	73.3	7.0	61.1	7.8	56.6	5.8	67.7	4.8	73.3
胶胞炭疽菌 <i>C. gloeosporioides</i>	25.0	16.8	32.8	5.5	78.0	6.0	75.0	16.3	34.8	15.3	38.8	6.3	74.8	5.3	78.8
尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>	21.0	15.5	26.2	5.3	74.8	5.3	74.8	16.5	21.4	19.0	9.5	5.5	73.8	5.5	73.8
大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>	21.0	11.3	46.2	3.5	83.3	4.0	81.0	13.8	34.3	8.8	58.1	3.8	81.9	4.0	81.0

注:大丽轮枝菌为接种病原菌饼后 9 d 测量,其他为 6 d 测量。
Note: *V. dahliae* was measured in the ninth day after inoculating and other was measured in the sixth day.

2.3 受抑菌丝丝的形态变化

显微观察发现,受抑制菌丝的形态发生了显著变化。F-S5、F-S12 和 F-S15 作用于灰葡萄孢和大丽轮枝菌后,受抑制菌的基内菌丝都不同程度出现了畸变、消解等现象(图 1)。虽然亲本菌株 SC11 也发

生此类现象^[9],但与融合菌株的不尽相同。由此可以看出,菌株 F-S5、F-S12 和 F-S15 保留了 SC11 的此种特性,即可能分泌了某种降解细胞壁的酶类和作用于原生质体的次生代谢物质。

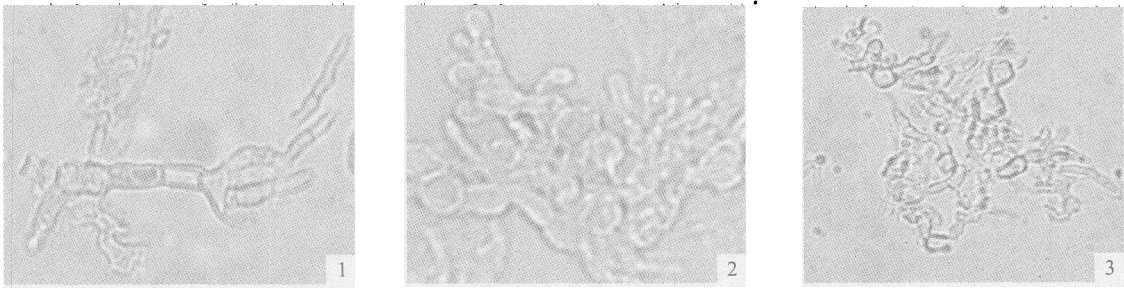


图 1 融合菌株对靶标病原真菌的作用效果

1. 融合菌株 F-S5 使大丽轮枝菌丝畸变并消解;2. 融合菌株 F-S12 使灰葡萄孢菌丝畸变;3. 融合菌株 F-S15 导致大丽轮枝菌丝消解

Fig. 1 Inhibiting effects of recombinant strains on target pathogens

1. Malformed and lysis mycelia of *V. dahliae* affected by strain F-S5; 2. Malformed mycelia of *B. cinerea* affected by strain F-S12; 3. Lysis mycelia of *V. dahliae* affected by strain F-S15

2.4 融合菌株的永久抑菌作用

为了进一步确定融合菌株是否保留了亲本的一些重要特性,本研究还测定了受抑制明显菌丝的再生能力。通过与亲本 SC11 对靶标病原真菌的永久

抑菌作用比较^[9]可以看出(表 3),除对尖孢镰刀菌外,几种抑菌作用显著的融合菌株仍然保留着亲本对其他所有供试靶标病原真菌的作用,尤其对灰葡萄孢的永久抑制作用显著高于亲本 SC11。

表 3 融合菌株对 5 种靶标病原真菌的永久抑菌作用

Table 3 Permanent Inhibiting effects of the recombinant strains on five target pathogens

靶标病原真菌 Target pathogens	CK			F-S5			F-S12			F-S15			F-S16		
	1 d	3 d	5 d	1 d	3 d	5 d	1 d	3 d	5 d	1 d	3 d	5 d	1 d	3 d	5 d
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	8	33	47	0	7	40	—	—	—	0	6	33	0	12	30
粉红聚端孢 <i>T. roseum</i>	10	30	48	0	10	33	4	21	34	0	2	2	0	5	34
胶胞炭疽菌 <i>C. gloeosporioides</i>	8	29	42	2	7	8	—	—	—	7	27	38	2	25	39
尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>	14	34	45	12	31	41	—	—	—	9	30	41	4	22	41
大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>	4	12	18	1	6	13	0	5	11	0	2	4	0	5	10

从图 2~图 5 还可以看出,粉红聚端孢、大丽轮枝菌、灰葡萄孢受 F-S5, F-S16 抑菌后菌丝虽然可以生长,但生长速率明显小于对照,表明解除抑菌物质后部分靶标病原真菌的菌丝在适宜的营养生长条件下可以逐渐恢复生长;胶胞炭疽菌受 F-S5 抑菌后,大丽轮枝菌受 F-S15 抑菌后生长量几乎保持不

变,这可能是由于抑菌物质已经对其造成破坏,恢复生长的菌丝失去了吸收营养的能力;粉红聚端孢受 F-S15 抑菌后,被抑菌丝几乎不能恢复生长,这可能是由于靶标菌丝已被放线菌分泌的次生代谢物完全破坏,失去了生长能力而达到永久的抑菌效果。

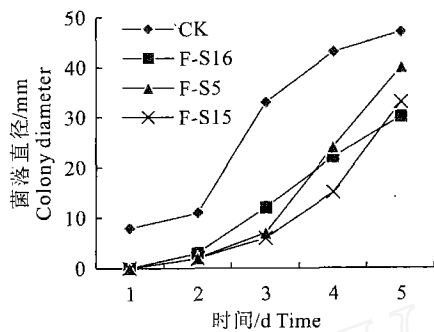


图 2 灰葡萄孢受抑后菌丝的再生能力
Fig. 2 Growth of mycelium on *B. cinerea*

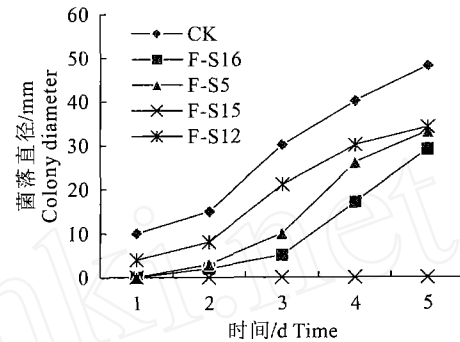


图 3 粉红聚端孢受抑后菌丝的再生能力
Fig. 3 Growth of mycelium on *T. roseum*

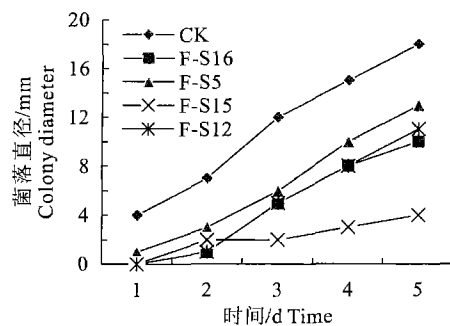


图 4 大丽轮枝菌受抑后菌丝的再生能力
Fig. 4 Growth of mycelium on *V. dahliae*

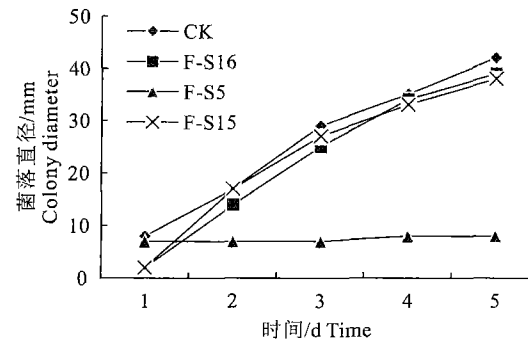


图 5 胶胞炭疽菌受抑后菌丝的再生能力
Fig. 5 Growth of mycelium on *C. gloeosporoides*

3 讨论

植物病害生物防治是一项复杂的生态系统工程,影响因子极为庞杂,但最关键的是首先要获得有效的野生优秀菌株。分离筛选的野生放线菌的生长定殖往往滞后于靶标致病菌,有些种类对环境适应范围太窄、对农药的反应比靶标菌敏感、对靶标致病菌的抑菌谱较窄、控制作用缓慢,难以在植物病害可持续控制中发挥重要作用;同时,从自然界分离、筛选理想的生防菌比较费时费力,需要大量的前期工作。原生质体融合可以使无性繁殖的放线菌通过基因组的随机重组突变进行遗传改良,是现阶段最为现实可行、易于广泛开展的生物工程手段^[10,11]。

本研究将现有的重寄生链霉菌 F46 和生防放线菌 SC11 进行原生质体融合后,经筛选共得到 5

株融合菌株,它们与亲本菌株在形态特征,包括菌丝颜色、菌落形态、产孢量等方面都有很大区别;从皿内实验结果可以看出,融合菌株的抑菌活性大部分介于两亲本之间,并在不同程度上保留了亲本 SC11 的永久抑菌特性,这可能是由于融合菌株继承了两亲本重组后的遗传物质,说明通过原生质体融合改良生防放线菌是可行的。由于融合菌株保留了亲本 SC11 较强的拮抗特性,使离体检测其是否携带亲本 F46 的重寄生特性的实验变得较为复杂,重寄生特性的确定还有待于活体实验。

在目标性状比较复杂的情况下,如何准确筛选融合菌株是此类研究需要解决的关键性问题。本研究利用再生菌株与两个亲本在菌落特征和颜色上的明显差异筛选出的 8 株菌株中,有 5 株保留了亲本的抑菌特性,说明这些性状之间存在着一定的相关

性,可以用于生防放线菌融合菌株的初筛。

在具体的融合过程中,首先将两个亲本 F46 和 SC11 的原生质体进行了灭活,从而可以推断再生菌落是真正的双亲原生质体融合形成的,但也不排除其他假相。原生质体具有特殊的细胞结构,其形成与

再生又涉及复杂的生物过程,在这个过程中常常会使次生代谢产物的调节发生变化形成突变株^[8]。本研究筛选的融合子的真伪及其遗传物质主要源于哪个亲本,还需通过分子生物学方法进一步确定。

[参考文献]

- [1] 雷肇祖,钱志良,章健.工业改良评述[J].工业微生物,2004,34(1):39-51.
- [2] 乔红萍,宗兆锋.重寄生菌 F46 和 PR 对苹果采后病害三种致病菌的控制作用[J].中国生物防治,2003,19(1):76-79.
- [3] 乔红萍,宗兆锋.用重寄生菌防治植物病害[J].中国生物防治,2002,18(4):176-179.
- [4] 李祥镕,安志东,朱非.林肯链霉菌双亲灭活原生质体融合的研究[J].氨基酸和生物资源,2001,23(4):24-27.
- [5] Pettey T M, Crawford D L. Enhancement of lignin degradation in *Streptomyces* spp. by protoplast fusion[J]. Appl Environ Microbiol, 1984,47(2):439-440.
- [6] Maria G C, José L L F, Galba M C T. Protoplast formation and regeneration from *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 and clavulanic acid production[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2002, 33:347-351.
- [7] 程骥,洪文荣,苏建章,等.黑暗链霉菌与卡那链霉菌原生质体融合研究[J].福州大学学报,2003,31(2):111-115.
- [8] 邱雁临,曾莹,胡赛阳,等.原生质体融合子代的筛选和鉴定[J].生物技术,2003,13(6):17-19.
- [9] 韩立荣,赵科刚,顾彪,等.5株生防放线菌对9种靶标病原真菌的永久抑菌作用研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(2):53-56.
- [10] 刘秋,吴元华,于基成,等.链霉菌原生质体融合技术研究进展[J].沈阳农业大学学报,2002,33(5):383-386.
- [11] Kieser T, Bibb M J, Hopwood D A, et al. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. Norwich, United Kingdom: The John Innes Foundation, 2000.

Identification of recombinants of hyperparasitic *Streptomyces* F46 and biocontrol actinomycetes SC11

LIU Bing, ZONG Zhao-feng, WANG Ji-xia

(College of Plant Protection, Northwestern A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The protoplast fusion between hyperparasitic *Streptomyces* strain F46 and biocontrol actinomycetes strain SC11 was studied and eight recombinant strains were isolated based on the morphological characteristics and colour of colony. The strong inhibiting effects *in vitro* of strain SC11 on the target pathogens were inherited by five recombinant strains F-S5, F-S8, F-S12, F-S15 and F-S16. The strain F-S8 had obvious inhibiting effects (>60%) on *Trichothecium roseum* and strain F-S12 had nearly the same effects on *T. roseum* and *Verticillium dahliae*. Strain F-S15 had nearly permanent inhibiting effects on *T. roseum*; The strong permanent inhibiting effects were observed on strain F-S5 to *Colletotrichum gloeosporioides* and strain F-S15 to *V. dahliae*. The malformed and/or lysis mycelia of target pathogens were found when affected with the recombinant strains.

Key words: hyperparasitic *Streptomyces* F46; actinomycetes SC11; protoplast fusion; recombinants