

用原生质体融合技术提高植物内 生放线菌的抗菌活性

陈丽萍,宗兆锋,李春玲,郭萍萍,蹇天佑

(西北农林科技大学 植保学院与陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**提高植物内生放线菌 SF4 和 SG2 的抗菌活性,获得具有更好生防效果的工程放线菌,为植物病害生物防治奠定基础。**【方法】**运用原生质体融合技术,将 SF4、SG2 和 SC1 进行融合,研究融合菌株的皿内抑菌活性及持续抑菌作用,并测定了其内生性和多胺效果。**【结果】**筛选获得了 12 株形态特征和菌落颜色与亲本菌株有差异、且遗传性状稳定的融合菌株,其中 F-G1、F-G7、F-G11、F-G12、F-G15 和 G-C5 等 6 株融合菌株对病原真菌有较强的抑制作用;菌株 F-G11 对灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的抑制率为 71.5%,F-G15 对西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)和梨状毛霉(*Mucor piriformis*)的抑制率达到 73%,且有持续抑制作用;融合菌株 F-G1、F-G11 和 F-G15 继承了亲本的内生性和广泛定殖性;6 株融合菌株均能产生多胺。**【结论】**原生质体融合技术实现了植物内生放线菌之间,以及植物内生放线菌和土壤中生放线菌之间的融合,是改良放线菌特性的有效手段。

[关键词] 生防放线菌 SC1;植物内生放线菌;原生质体融合;西瓜枯萎病菌;抗菌活性

[中图分类号] Q939.13⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2008)10-0158-05

Improvement of endophytic actinomycetes by protoplast fusion

CHEN Li-ping, ZONG Zhao-feng, LI Chun-ling, GUO Ping-ping, QIAN Tian-you

(College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to improve the biocontrol character of endophytic actinomycetes SF4, SG2. **【Method】** Technology of protoplast fusion was used to improve the wild strains. **【Result】** Twelve recombinant strains were isolated based on the morphological character, color of colony and stable genetic determinant, six effective recombinant strains: F-G1, F-G7, F-G11, F-G12, F-G15 and G-C5, which have strongest inhibition to target pathogen, were screened. The strain F-G15 had obvious inhibiting effects (>73%) and had permanent inhibiting effects on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mucor piriformis*, the strain F-G11 had same effects (>70%) on *Botrytis cinerea*. Recombinant strains F-G1, F-G7, F-G11, F-G12, F-G15 and G-C5 were isolated from three different plants and also can produce polyamines. The parents' endophytic character, wide colonization and producing polyamines were inherited by six recombinant strains. **【Conclusion】** Apparently, achieving protoplast fusion between endophytic actinomycetes and biocontrol actinomycetes by the technology of protoplast fusion is an effective method to improve the endophytic actinomycetes character.

Key words: actinomycetes SC1; endophytic actinomycetes; protoplast fusion; *Fusarium oxysporum* f.

* [收稿日期] 2007-10-15
[基金项目] 教育部创新团队发展计划项目(200558);国家高等学校学科创新引智计划项目(B07049);西北农林科技大学创新团队项目
[作者简介] 陈丽萍(1982—),女,陕西西安人,在读硕士,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: chenliping198282@163.com
[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。E-mail: zfzong@nwsuaf.edu.cn

sp. niveum; antimicrobial activity

微生物原生质体融合已成为生物工程研究中的一项重要内容,也是现阶段最为现实可行、最易广泛开展并收到实效的生物工程手段^[1]。原生质体融合技术破除细胞壁的阻碍,使亲本经染色体交换、重组,将优良性状通过融合再组合到一个新单菌株中。其较传统基因工程技术简单易行、效率高,在微生物菌种选育中具有广泛的应用前景^[2]。

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,已经分离筛选出多种具有良好生防效果的放线菌^[3],并已通过原生质体融合技术对重寄生链霉菌 F46 和生防放线菌 SC1、SC11 进行了改良,得到了性状优良的融合子^[4],但以上研究都是利用从土壤中分离的放线菌进行融合的。基于植物内生放线菌在植物中定殖可增强宿主的抗逆性和提高植物生产力等优点^[5],本研究利用原生质体融合技术,将植物内生放线菌 SF4 和 SG2,与从土壤中分离的具有较强拮抗作用的生防放线菌 SC1 进行融合,得到具有更好生防效果的工程放线菌,以期为植物病害的生物防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:植物内生放线菌 SF4、SG2 和生防放线菌 SC1,均由西北农林科技大学病害生物防治实验室提供。

植物病原真菌:梨状毛霉(*Mucor piriformis*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. *sp. niveum*)、胶胞炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)和茄链格孢菌(*Alternaria solani*),均由西北农林科技大学病害生物防治实验室提供。

试剂:溶菌酶和蜗牛酶,均由宝鑫生物公司提供。

1.2 原生质体融合

1.2.1 原生质体制备 各取供试菌株的孢子悬浮液 0.2 mL,分别接种于菌丝培养液中,25 ℃、150 r/min 恒温摇床培养 48 h 后,转接入含有 0.5% Gly 和 30% 蔗糖的菌丝培养液^[6]中,继续培养 48 h 后,取 5 mL 培养液离心,反复用磷酸缓冲液洗涤,收集菌丝体之后,加入溶菌酶和蜗牛酶(质量比 1:1)混合酶液,35 ℃ 水浴中酶解。用差速离心沉淀原生质体。最后,将原生质体悬于磷酸缓冲液中^[3-4,7-8]备用。

1.2.2 原生质体灭活 将制备的原生质体分别进

行热灭活和紫外灭活^[9],以不进行任何灭活处理的为对照。

1.2.3 原生质体的融合与再生 将经过上述处理的双亲或三亲原生质体悬液相互等量混合,3 000 r/min 离心 10 min,使原生质体沉降,之后,加入 2 mL 40% 的 PEG6000,于 35 ℃ 水浴中融合 5 min,用磷酸缓冲液终止反应,洗涤 1~2 次后,涂布于再生平板上,28 ℃ 恒温培养 5~6 d,使其再生^[10]。

1.3 融合子的筛选

1.3.1 融合子的获得 根据菌落特征,在再生培养基上初筛与亲本菌株形态及颜色不同的菌落作为融合子,将所获得的融合子经过 7 次继代培养^[11]后,选出性状稳定的融合子备用。

1.3.2 皿内抑菌作用的测定 筛选出的融合菌株采用平板对峙法测定皿内抑菌作用^[12]。选择 5 种常见的植物病原真菌作为靶标真菌,包括梨状毛霉、西瓜枯萎病菌、胶胞炭疽病菌、灰葡萄孢和茄链格孢菌。每处理重复 3 次,取平均值。

抑制率/% = (1 - 处理菌落半径/对照菌落半径) × 100%。

在测定皿内抑菌作用的后期,为了进一步确定解除融合菌株分泌的抑菌物质后,靶标真菌中受抑制的菌丝能否恢复其生长能力,融合菌株是否继承了亲本菌株的一些重要特性,本研究进行了持续抑菌作用的测定。从被抑制的菌落边缘,挑取少量靶标真菌基内菌丝接种于 PDA 平板上,以正常基内菌丝为对照,在 25 ℃ 恒温培养箱中培养,定期观察菌丝生长情况,测量菌落直径,以及受抑制靶标真菌菌丝的再生能力^[13],确定融合子是否继承了亲本菌株的持续抑菌作用。每处理重复 3 皿。

1.3.3 融合子内生性的测定 将融合菌株通过浸种法和灌根法^[14]接种黄瓜、番茄和大豆 3 种植物,20 d 后取接种植物的根、茎、叶,用常规分离方法^[12]分离,确定融合菌株是否继承了亲本菌株的内生性。

1.3.4 多胺效果的测定 将亲本与融合子以划线或点点的形式,使其分布于鉴别培养基上,以不涂布的为对照,28 ℃ 恒温培养箱内培养 5~7 d,观察鉴别培养基的变化。

2 结果与分析

2.1 融合子的获得

试验发现,制备原生质体的时间较长,而且融合

频率不高,但仍然有不同性状的菌落再生。根据融合菌株与亲本菌株菌落形态和颜色的比较发现,共获得 25 株融合子。将获得的融合子经过 7 次继代培养,筛选出了 12 株遗传性状较为稳定的融合子,结果见表 1。由于供试菌株经过紫外灭活和热灭活后失去再生能力,而获得的融合菌株与亲本菌株在菌落形态和菌丝颜色上明显不同,所以初步认为,在再生培养基上长出的菌落为融合菌株,对于融合菌株的进一步确定,还有待于进行 16S rDNA 序列分析。

表 1 12 株融合菌株与亲本菌株菌落特征的比较

Table 1 Colony character of the parents and twelve recombinant strains

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
SC1	圆形,表面绒毛状 Round with villiform surface	合欢红色 Red like silktree	红色 Red	++
SG2	辐射状,表面粉状 Radiate with powdery surface	象灰色 Grey	中灰驼色 Camel	+++
SF4	辐射状,表面粉状 Radiate with powdery surface	乳白色 Creamy white	杏仁黄色 Yellow like almond	++
F-G1	圆形,表面霉状 Round with mildew surface	磨石紫色 Purple like millstone	茉莉黄色 Jasmine	++++
F-G3	圆形,表面粉状 Round with powdery surface	燕颌蓝色 Swallow blue	水牛灰色 Grey like buffalo	++
F-G7	辐射状,表面粉状 Radiate with powdery surface	田鼠灰色 murine	大理石灰色 Grey like marble	+++
F-G8	圆形,表面粗糙 Round with coarse surface	砚灰色 Grey like inkstone	古鼎灰色 Grey like tripod	+++
F-G11	圆形,表面粉状 Round with powdery surface	黄昏灰色 Dark grey	灰蓝色 Bice	++++
F-G12	辐射状,中间突起 Radiate with central salience	白色 White	豆汁黄色 Yellow like juice	++++
F-G13	圆形,中间平坦 Round without central salience	浓鹤灰色 Light grey like crane	蚌肉白色 White	++
F-G15	辐射状,表面粉状 Radiate with powdery surface	白色 White	火鸡紫色 Purple like turkey	+++
F-G16	圆形,中间突起 Round with central salience	乌贼灰色 Grey like cuttlefish	淡棕色 Light brown	++
G-C5	圆形,中间平坦 Round without central salience	豆蔻紫色 Purple like cardamom	墨紫色 Dark purple	+++
G-C7	圆形,表面粗糙 Round with coarse surface	中灰驼色 Medium grey	金黄色 Yellow like golden	++++
F-C2	圆形,中间有凹陷 Round with central hollow	苍蓝色 Grey	深灰蓝色 Dark bice	+

注:“+”表示产孢量的多少。
Note:Quantity of producing spores was indicated by “+”.

2.2 皿内抑菌效果

标病原真菌的抑菌效果,筛选出 6 株融合子,结果见

采用平板对峙法测定了 12 株融合子对 5 种靶

表 2。

表 2 6 株融合菌株及其亲本对 5 种靶标病原真菌的皿内抑菌作用

Table 2 Inhibiting effects of the parents and the six recombinant strains on five target pathogens

靶标病原真菌 Target pathogens	对照菌落 半径/mm CKcolony radius	抑制率/% Inhibition ratio								
		SC1	SF4	SG2	F-G1	F-G7	F-G11	F-G12	F-G15	G-C5
西瓜枯萎病菌 <i>F. oniveum</i>	22.0	25.2	26.1	32.7	54.2	11.8	14.9	42.5	73.3	35.8
茄链格孢菌 <i>A. solani</i>	21.0	37.7	54.7	56.4	60.7	68.7	51.2	56.3	60.1	54.7
胶胞炭疽病菌 <i>C. gloeosporioides</i>	19.0	51.2	48.7	43.6	65.8	26.7	45.2	37.5	62.4	47.3
梨状毛霉 <i>M. piri formis</i>	22.7	54.4	60.1	51.7	37.7	39.1	33.9	33.2	73.6	41.9
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	23	47.9	55.3	38.1	43.5	51.8	71.5	46.2	36.7	34.0

注:梨状毛霉和灰葡萄孢为接种病原真菌菌饼后 3 d 测量,其他为 6 d 测量。
Note:*M. piri formis* and *B. cinerea* were measured in the third day after inoculating and the other were measured in the sixth day.

由表 2 可以看出,F-G1、F-G7、F-G11、F-G12、F-G15 和 G-C5 等 6 株融合子对 5 种靶标真菌均有一定的抑制作用,而且同一菌株对不同靶标真菌的作用效果不同,不同菌株对同一靶标真菌的作用效

果差异也较大。其中,融合子 F-G15 对西瓜枯萎病菌和梨状毛霉的拮抗作用较强,抑制率分别为 73.3%和 73.6%,均超过 70%,且对西瓜枯萎病菌的抑制率远远超过了亲本菌株;融合子 F-G1 和 F-G15 对胶胞炭疽病菌的抑制率分别为 65.8%和 62.4%,也均强于亲本菌株;融合子 F-G7 对茄链格孢菌的抑制率达到 68.7%。总体来看,不同融合菌株对不同病原真菌的抑制率基本上大于亲本菌株或与亲本菌株相当,有个别融合菌株对病原真菌的抑制率小于其亲本菌株。融合子 F-G15 总体表现突出,对西瓜枯萎病菌、茄链格孢菌、胶胞炭疽病菌、梨状毛霉 4 种病原真菌的抑制率依次达到 73.3%,60.1%,62.4%和 73.6%。基于融合子整体的抑菌表现,融合后的菌株不仅继承了亲本菌株的优良特

表 3 6 株融合菌株及其亲本对 5 种靶标病原真菌的持续抑菌作用

靶标病原真菌 Target pathogens	菌落直径/mm The diameter colony									
	CK	SC1	SF4	SG2	F-G1	F-G7	F-G11	F-G12	F-G15	G-C5
西瓜枯萎病菌 <i>F. oniveum</i>	40.8	0	25.0	0	10.0	40.0	20.0	15.0	0	29.0
茄链格孢菌 <i>A. solani</i>	45.7	34.0	30.0	20.0	15.0	12.0	4.0	25.0	9.0	12.0
胶胞炭疽病菌 <i>C. gloeosporioides</i>	43.2	30.5	15.0	18.0	8.0	8.0	9.0	10.0	21.0	20.0
梨状毛霉 <i>M. piriiformis</i>	78.5	57.2	0	30.0	18.0	34.0	40.0	60.5	0	40.0
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	68.2	60.5	40.0	45.0	15.0	40.0	9.0	50.0	25.0	37.0

2.4 融合子的内生性

由表 4 可以看出,从 3 种植物上可以分别分离得到 5 种融合子,说明这 5 株融合菌株继承了亲本的内生特性,并且融合菌株 F-G1、F-G11 和 F-G15 可以从 3 种植物上同时分离得到,表明这 3 株融合

表 4 6 株融合菌株在 3 种植物不同组织中的定殖能力

Table 4 Six recombinant Strains colonize the tissues of three different plants of different parts

供试作物 Test plants	融合菌株 Recombinant strains	
	根 Root	茎 Stem
黄瓜 Cucumber	F-G1,F-G11,F-G12,F-G15	F-G15
大豆 Soybean	F-G1,F-G7 ,F-G11,F-G12,F-G15,G-C5	F-G1,F-G15
番茄 Tomato	F-G1,F-G7,F-G11,F-G15	F-G7

2.5 亲本与融合子产生多胺的效果

多胺,包括精胺、亚精胺、腐胺,广泛存在于放线菌中,是一种具有生物活性的低分子量脂肪族含氮碱,其对植物生长具有促进作用。根据融合菌株与亲本在鉴别培养基上的颜色变化,融合菌株继承了亲本菌株产多胺的特性。

3 讨 论

植物病害生物防治基本上是利用特性单一、效

性,而且部分还超过了亲本菌株。

2.3 融合菌株的持续抑菌作用

由表 3 可以看出,西瓜枯萎病菌受 F-G7 抑制后,以及梨状毛霉和灰葡萄孢受 F-G12 抑制后菌丝生长速率略小于对照,表明解除抑菌物质后,靶标病原真菌的菌丝在适宜的营养条件下可以逐渐恢复生长。靶标病原真菌受其他融合菌株抑制后菌丝生长速率明显小于对照,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。融合菌株 F-G15 的持续抑菌作用比较突出,对西瓜枯萎病菌和梨状毛霉有持续抑菌作用,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,继承了亲本菌株这一特性。

菌株同时也继承了亲本菌株广泛定殖这一特性。根部分离出的融合菌株较多,而茎部较少,叶部没有,这可能是由于融合菌株在植物体内的定殖及传导速率不同,这也是由亲本菌株在植物体内定殖及传导特性所决定的。

率有一定局限的野生菌株,分离、筛选优秀菌株工作量大,周期长。原生质体融合技术不仅可以使基因高频重组,而且可以集双亲优良性状于一体。本研究利用原生质体融合技术实现了植物内生放线菌之间以及植物内生放线菌和土壤放线菌之间的融合,并且通过平板对峙法进行初筛,获得了 6 株对不同病原真菌抑菌效果相对较好、并且有些还超过亲本菌株的融合子。但这些融合子的获得是通过失活原生质体供体法,本研究所筛选到的融合子的真伪以

及其遗传物质来源,还需要通过分子生物学方法进一步确定。原生质体融合的主要目的是要获得具有新的优良性状的稳定融合子,融合子的选择方法是原生质体融合技术的关键,因此,如何进一步筛选融合子,也有待于进一步探讨。

[参考文献]

[1] Kieser T,Bibb M J,Hopwood D A, et al. Practical *Streptomyces* genetics[M]. Norwish, United Kingdom: The John Innes Foundation,2000.

[2] 张彩霞,王金艳,于晓丹,等. 原生质体融合技术在生防菌株筛选中的应用 [J]. 杂粮作物,2004,24(5):301-302.
Zhang C X,Wang J Y,Yu X D, et al. Application of screening biocontrol strains by the technology of protoplast fusion [J]. Rain Fed Crops,2004,24(5):301-302. (in Chinese)

[3] 刘冰,宗兆锋,王记侠. 重寄生链霉菌 F46 与生防放线菌 SC11 融合菌株的筛选 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(3):93-97.
Liu B,Zong Z F,Wang J X. Identification of recombinants of hyperparasitic *Streptomyces* F46 and biocontrol actinomycetes SC11 [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2006,34(3):93-97. (in Chinese)

[4] 王记侠,宗兆锋,刘冰. 重寄生链霉菌 F46 与生防放线菌 SC1 融合子的筛选 [J]. 西北农业学报,2005,14(6):125-127.
Wang J X,Zong Z F,Liu B. The fusants screen of hyperparasitic *Streptomyces* F46 and *Streptomyces* SC1 [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2005, 14 (6): 125-127. (in Chinese)

[5] 梁亚萍,宗兆锋,马强. 6 株野生植物内生放线菌防病促生作用的初步研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(7):131-136.
Liang Y P,Zong Z F,Ma Q. Inhibiting and promoting effect on plants of six strains endophytic actinomycetes isolated from wild plants [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2007,35(7):131-136. (in Chinese)

[6] 皇甫张娟,顾彪,宗兆锋. 生防放线菌原生质体融合条件研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(4):109-114.
Huangfu Z J,Gu B,Zong Z F. Studies on protoplast fusion between strain of F46 and strain of SC1, SC11 [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2007,35(4):109-114. (in Chinese)

[7] 李祥锴,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.
Li X K,An Z D,Zhu F. Study on fusion of biparental inactivated protoplast of *Streptomyces lincolnensis* [J]. Amino Acids & Biotic Resources,2001,23(4):24-27. (in Chinese)

[8] 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:自然科学版,2003,31(2):111-115.
Cheng J,Hong W R,Su J Z, et al. Study on protoplast fusion between *Streptomyces tenebrarius* and *Streptomyces kanamyceticus* [J]. Journal of Fuzhou University: Natural Sciences Edition,2003,31(2):111-115. (in Chinese)

[9] Richard H,Baltz R H. Genetic recombination by protoplast fusion in *Streptomyces* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,1999(22):460-471.

[10] Maria das 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.

[11] 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.
Qiu Y L,Zeng Y,Hu S Y, et al. Screening and identifying of protoplast fusion progeny [J]. Biotechnology, 2003, 13 (6): 17-19. (in Chinese)

[12] 宗兆锋,乔宏萍,何杞真. 2 株重寄生菌的分离和对靶标菌的抑制作用 [J]. 西北农业学报,2002,11(4):1-4.
Zong Z F,Qiao H P,He Q Z. Isolation of 2 strains of hyperparasite and its inhibiting effects on target pathogens [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2002, 11 (4): 1-4. (in Chinese)

[13] 韩立荣,赵科刚,顾彪,等. 5 株放线菌对 9 株靶标菌的持续抑菌作用 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(2):53-56.
Han L R,Zhao K G,Gu B, et al. Persistent inhibiting effects of five strains of actinomyces on nine strains of target pathogens [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2006,34(2):53-56. (in Chinese)

[14] 郭小芳,宗兆锋,杨洪俊. 6 种放线菌的抗药性标记和在植物体内定殖能力测定 [J]. 西北农业学报,2005,14(2):69-73.
Guo X F,Zong Z F,Yang H J. Resistance tag of 6 strains of actinomyces and their colonized ability in plants [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2005, 14 (2): 69-73. (in Chinese)