

# 黄瓜黑星病菌原生质体制备的条件及再生菌株的致病性

王云帆<sup>1</sup>, 王刚<sup>2</sup>

(1. 重庆科技学院 化学化工学院, 重庆 401331; 2. 河南大学 生命科学学院, 河南 开封 475001)

**摘要:** 分别利用崩溃酶、溶壁酶、纤维素酶和蜗牛酶酶解黄瓜黑星病菌, 进行原生质体的制备试验。结果表明: 4 种酶均能消化该菌细胞壁, 获得一定数量的原生质体; 产生原生质体效率最高的是崩溃酶, 该酶在浓度为 18 mg/mL 时产生的原生质体数量最多, 最佳酶解时间为 2~3 h, 最适作用温度为 28℃。制备的原生质体可以再生并与原始出发菌株具有相同的致病能力。

**关键词:** 黑星病; 原生质体; 致病性

**中图分类号:** S 436.421.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)11-0173-03

由瓜枝孢霉 (*Cladosporium cucumerium* Ell. et. Arth.) 所导致的黄瓜黑星病是一种世界性病害, 其危害是毁灭性的<sup>[1]</sup>。1889 年 Arthur J C 在美国首次报道了黄爪瓜条上受黑星病侵害的情况, 并与 Ellis J B 一起定名为 *Cladosporium cucumerium* Ellis and Arthur。国内黑星病 1959 年在吉林首次报道, 20 世纪 70 年代末, 随保护地栽培的发展, 黑星病开始在我国东北地区发生, 20 世纪 80 年代开始流行<sup>[2]</sup>。黄瓜黑星病的疫区逐步扩大, 各地均有黄瓜黑星病发生的报道, 甚至在我国的海

南省发现了黄瓜黑星病。  
国内目前仅在黑星病的田间发病情况调查、病菌的生物学特性、品种抗病性鉴定以及人工接种鉴定技术等方面做了一些研究<sup>[3]</sup>。为了从根本上防治该病害的发生, 拟从分子水平研究其致病机制, 克隆相关致病基因。而突变体的获得是解析致病菌致病机理的有效手段, 利用原生质体通过遗传转化向病菌基因组随机插入外源 DNA, 是创造真菌突变体的常用方法<sup>[4]</sup>。通过制备黄瓜黑星病菌的原生质体, 进而发展出有效的遗传转化体系, 有望分离出多个无毒基因和致病相关基因。该研究就制备黄瓜黑星病菌原生质体的方法和原生质体再生菌株的致病性等方面进行了探讨。

## 1 材料与方法

**第一作者简介:** 王云帆(1981-), 女, 河南安阳人, 硕士, 助教, 主要从事植物病害防治研究工作。E-mail: wangyunfan@yeah.net。  
**收稿日期:** 2008-05-28

# The Degrading Condition and Pathway of Isocarbophos by *Bacillus laterosporus*

DU Chun-mei<sup>1</sup>, JIN Shu-chao<sup>1,2</sup>, FAN Jing<sup>3</sup>, YANG Hui<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Microbiology, College of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080, China; 2. Beijing Economic Technological Development Area Experimental School, Beijing 100080, China; 3. College of Agriculture, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080, China)

**Abstract:** The degrading condition and pathway of an isocarbophos degrading bacterium, *Bacillus laterosporus* BL-21, were studied with orthogonal experiment and GC-MS. The results indicated that the optimum degrading ispcarbophos carbon and nitrogen sources of *Bacillus laterosporus* BL-21 were sucrose 1.5% and ammonium bicarbonate 0.06% respectively. The optimum temperature, pH and rotation speed were 30℃, pH 7 and 200 r/min respectively. While with 30 mL liquid in 250 mL flask, inoculum size 10%, and add 10~20  $\mu$ L TritonX-100, strain BL-21 could degrade isocarbophos well. Using GC-MS, the intermediate products of biodegradation of isocarbophos by the strain BL-21 were detected. The results suggested that o, o'-s-trimethyl phosphorothioate and isopropyl salicylate were the main intermediate products. The o, o'-s-trimethyl phosphorothioate was further degraded into inorganophosphate, sulfid and the ammonia. Moreover, The isopropyl salicylate was also further degraded, and created salicylamide, salicylic acid and other organic acids, at last these materials would come into being carbon dioxide and waters. Therefore, these biodegradation productions of isocarbophos by strain BL-21 were lower toxicity and biological safety.

**Key words:** *Bacillus laterosporus*; Isocarbophos; Degrading condition; Degrading pathway

## 1.1 供试菌株和黄瓜品种

黄瓜黑星菌 (*Cladosporium cucumerinum*) 由中国农科院蔬菜花卉所提供。黄瓜品种新泰密刺 (感病) 由山东新泰市雷育黄瓜研究所提供。

## 1.2 培养基

固体培养基: PDA 培养基; 液体培养基: PDB 培养基; 等渗液: NaCl 0.7 mol/L, STC 等渗液: Sorbitol 1.2 mol/L, Tris-HCl (pH 7.5) 10 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 50 mmol/L; 再生培养基: 酵母提取物 0.5 g/L, 酪素 (酶水解) 0.2 g/L, NaNO<sub>3</sub> 4.0 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.0 g/L, KCl 441.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.52 g/L, 葡萄糖 10 g/L, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 mg/L, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 1 mg/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O 50 mg/L, pH 6.5。

## 1.3 细胞壁消解酶液

崩溃酶 Driselase (Sigma); 溶壁酶 Lywallzyme (广东微生物研究所); 纤维素酶 Cellulase (Serva); 蜗牛酶 Snailase (北京)。各酶均用 0.7 mol/L NaCl 等渗液配制。

## 1.4 原生质体的制备步骤

1.4.1 黄瓜黑星病菌的液体摇培 在长满黄瓜黑星病菌的 PDA 平板内倒入无菌水, 用灭过菌的棉签将孢子小心的刮下来, 1 层无菌擦镜纸过滤后配成固定浓度的孢子悬浮液, 取 3 mL 接入盛有 90 mL PDB 培养基的 500 mL 三角瓶内, 120 r/min, 23℃ 摇培 1 d。

1.4.2 原生质体的制备 离心收集液体摇培的菌丝团, 0.7 mol/L NaCl 冲洗, 称重, 置于 50 mL 离心管中, 分别加入等重的各种细胞壁裂解酶, 置于一定温度下振荡酶解 (150 r/min), 一定时间后取出, 3 层无菌擦镜纸过滤,

0.7 mol/L NaCl 冲洗, 冰浴收集到 50 mL 离心管中, 3 500 r/min 离心 (4℃) 15 min, 冰浴加入 10 mL STC 溶液后混匀, 2 000 r/min 离心 15 min, 去上清, 根据 1 g 出发菌丝加 200 μL 比例加入 STC 溶液, 轻微振荡后用血球记数板计数, 计算单位重量 (1.0 g) 菌丝消解后获得的原生质体的数量。

## 1.5 原生质体的再生

先将原生质体液体悬浮液接种于液体再生培养基中, 置于 23℃ 恒温箱中培养 24 h 后, 按以下方法涂布平板: 先在培养皿中倒一层含 1.5% 琼脂的再生培养基, 待冷凝后, 将原生质体悬液与预热的半固体再生培养基 (含 0.4% 琼脂) 混匀, 倾注于固体再生培养基平板上, 23℃ 培养 7 d, 挑取再生培养基上的单菌落, 于 PDA 培养基上培养, 形成再生菌株。

## 1.6 再生菌株的致病性测定

随机挑选 5 个再生菌株 (C1~C5), 利用李保聚<sup>[6]</sup>的方法进行致病性鉴定。黄瓜种子用 0.1% (w/v) 升汞表面消毒 5 min, 再用无菌水充分洗涤后 28℃ 催芽。播种于装有营养土的塑料花盆中, 置于 25℃ 光照培养箱中, 待长出真叶后接种黄瓜黑星病菌。将 PDA 平板上培养好的病菌用少量无菌水洗下孢子, 血球计数板计数, 调整浓度为 2 × 10<sup>6</sup>/mL, 加入 0.05% 的 Tween 20, 混匀后喷雾接种于黄瓜幼苗上, 接种后置于 20℃ 黑暗保湿 36 h, 然后在模拟自然光照条件下继续培养, 于接种 4 d 后调查发病情况, 确定病情指数<sup>[9]</sup>。每个再生菌株设置 10 个重复, 同时设置原始菌株接种的黄瓜幼苗和不接种的黄瓜幼苗作为阳性对照和阴性对照。

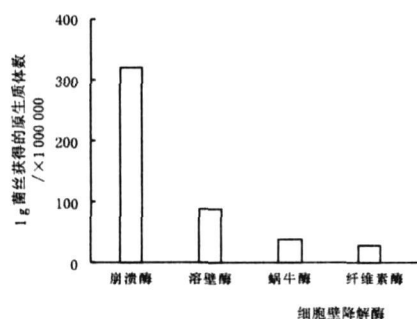


图1 4种酶制备原生质体的效果

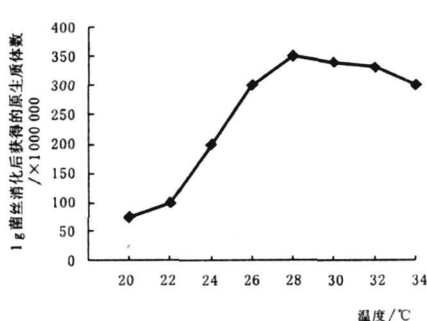


图2 温度对崩溃酶消化活性的影响

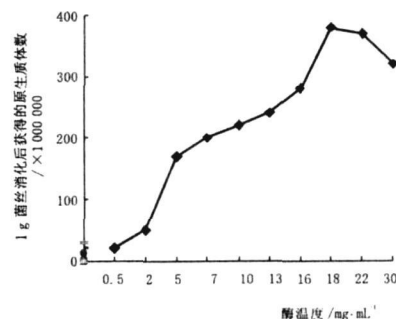


图3 崩溃酶浓度对制备原生质体的影响

## 2 结果与分析

### 2.1 黄瓜黑星病菌原生质体的制备

2.1.1 4种酶对黄瓜黑星病菌细胞壁降解效果比较 在制备真菌原生质体时, 不同的消化酶酶解细胞壁的效果因其真菌种类不同而异。为了选择降解黄瓜黑星病菌细胞壁较好的酶, 用浓度为 15 mg/mL 的 4 种消化酶对黑星病菌细胞壁的消化效果进行比较。由图 1 可知,

这 4 种酶虽然都可以酶解细胞壁获得一定数量的原生质体, 但效果差异很大, 崩溃酶 Driselase 消化作用效果最好, 其它酶的作用效果较差。

2.1.2 温度对 Driselase 酶解黄瓜黑星病菌细胞壁的影响 不同温度梯度下, 利用 15 mg/mL 浓度的 Driselase 对黄瓜黑星病菌细胞壁酶解 3 h 的试验结果见图 2, 该酶的最适作用温度为 28℃。在温度低时, Driselase 对病

菌细胞壁的消化能力较弱,随着温度的升高,其活性逐渐增强,到 28℃时达到高峰,随后缓慢下降。

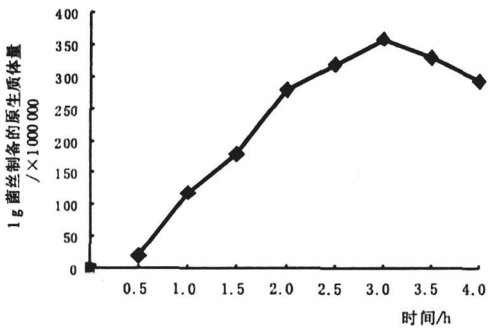


图 4 反应时间对制备原生质体的影响

2.1.3 酶浓度对制备原生质体影响 28℃条件下,以不同浓度的 Driselase 作用于黑星病菌菌丝 3 h,根据产生原生质体的数量来衡量酶最佳反应浓度(见图 3)。可以看出,在一定范围内,随着酶浓度的增加产生的原生质体的量也增加,当浓度为 18 mg/mL 时产生的原生质体数量最多;超过这个浓度,原生质体产生不再增加,反而有下降的趋势。因此利用 Driselase 大量制备黄瓜黑星病菌的原生质体时,酶浓度以 18 mg/mL 为最佳。

2.1.4 酶反应时间对制备原生质体的影响 相同试验条件(温度 28℃,酶浓度为 18 mg/mL)下, Driselase 产生原生质体的数量随着反应时间的增加而增多,反应 3 h 达到最大值,之后不再增加(图 4),其原因可能是黄瓜黑星病菌菌丝体在 3 h 内得到充分酶解,如果 3 h 后继续酶解,可能由于酶液的毒害作用,使得已经产生的原生质体破裂,导致原生质数量的减少。

表 1 原生质体再生菌株的致病性测定

菌株	发病率/%	病情指数
C0	0	0
C1	100	21.8
C2	100	23.7
C3	100	22.6
C4	100	23.1
C5	100	22.3
WT	100	23.2

2.2 黄瓜黑星病菌原生质体的再生菌株的致病性测定 利用喷雾接种法对 5 个随机选取的黑星病菌原生质体再生菌株进行致病性鉴定(表 1),可以看出,原生质体再生菌株与原始菌株间在致病性方面没有差异。

3 讨论

黄瓜黑星病菌作为一种半知菌,其细胞壁由几丁质、葡聚糖、蛋白质、半纤维素等多种成分构成,试验所用的单一酶如纤维素酶(Cellulase),不能完全降解黑星病菌的细胞壁,产生足够多的原生质体。蜗牛酶(Snailase)虽然是复合酶,可能由于所含酶的种类的关系,其更适合于降解含有葡聚糖较多的真菌,如酵母的细胞壁,而对黑星病菌的作用较弱。溶壁酶(Ly-wallyzyme)作为另外一类复合酶,对子囊菌的细胞壁消化作用较强。崩溃酶(Driselase)在多种植物病原真菌的原生质体制备中得到广泛应用<sup>[4,6]</sup>,对于黄瓜黑星病菌的细胞壁它同样具有较强的消化作用,能几乎完全降解黑星病菌的细胞壁而生成原生质体。试验比较了 4 种裂解酶消解黑星病菌细胞壁的能力,证明崩溃酶(Driselase)可以有效制备黑星病菌的原生质体。该研究还明确了制备黑星病菌时所用酶的最适浓度、最适温度和最适反应时间。黑星病菌原生质体的制备及再生技术的建立以及所证明的再生菌株仍具有致病性,为以原生质体为基础的各种物理化学诱变和进行限制性内切酶介导的整合(REMI)诱变及研究致病性变异的分子机理奠定了重要基础。

参考文献

[ 1 ] Strider D L. The effect of temperature, pH and various nutrients on the growth of *Cladosporium cucumerium*[ J ]. Phytopathology, 1960, 50: 583-588.  
[ 2 ] 李风云. 黄瓜黑星病防治技术研究[ J ]. 辽宁农业科学, 1998(1): 8-11.  
[ 3 ] 李保聚, 李风云, 苗则彦, 等. 黄瓜黑星病菌致病性研究[ J ]. 辽宁农业科学, 1997(6): 11-15.  
[ 4 ] Namiki F, Matsunaga M, Okuda, et al. Mutation of an Arginine Biosynthesis Gene Causes Reduced Pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis*[ J ]. Mol. Plant Microbe interact, 2001, 14(4): 580-584.  
[ 5 ] 李保聚, 李风云, 苗则彦, 等. 用黄化子叶喷雾接种法鉴定黄瓜黑星病抗性[ J ]. 中国蔬菜, 1997(6): 4-6.  
[ 6 ] Thon M R, Nuchles E M, Vaillancourt, LJ. Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*[ J ]. Mol. Plant Microbe Interaction, 2000, 13(12): 1356-1365.

Protoplast Preparation Conditions and Pathogenicity of Regenerated Strains of *Cladosporium cucumerium* Ell. et Arth

WANG Yun-fan<sup>1</sup>, WANG Gang<sup>2</sup>

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China; 2. College of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475001, China)

**Abstract:** *Cladosporium cucumerium* strain was used to prepare protoplast for transformation of the fungus. The protoplast was obtained by digestion of the fungal cell wall with each of the four lytic enzymes, among them Driselase had the highest efficiency. Most of the protoplasts were gained with 18 mg/mL Driselase for 3 h at 28℃. The prepared protoplasts could regenerate mycelium and produce similar pathogenicity to that of parental strains.

**Key words:** *Cladosporium cucumerium*; Protoplast; Pathogenicity