

番茄灰霉病菌作用方式不同木霉菌 REMI 突变株生物学特性的研究

刘 限¹, 黄 哲¹, 高增贵², 张晓敏¹

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:以木霉菌出发菌株 T21 及作用方式不同木霉菌 REMI 突变株为试材, 研究了对番茄灰霉病菌作用方式不同木霉菌突变株间孢子萌发和产孢能力的差异以及对不同温度、pH 值的适应性和对碳氮源的利用能力。结果表明: 突变株 Ttrm68 孢子萌发率最高, 为 98%; 突变株 Ttrm25 产孢能力最强, 极显著高于出发菌株 T21。不同木霉菌突变株对温度适应性有所改变, 菌株 Ttrm68 表现出耐高温, 在温度高达 40℃ 时仍能生长。不同木霉菌突变株在不同 pH 值下的培养性状和产孢情况有所改变, 菌株 Ttrm68 在碱性条件下能产厚垣孢子。不同木霉菌突变株对不同碳氮源的利用能力改变较大, 菌株 Ttrm68 能够充分利用各种碳氮源, 生长速度最快。

关键词:木霉菌 REMI 突变株; 灰霉病菌; 生防机制; 生物学特性

中图分类号:S 436.412.1⁺3; Q 939.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)17-0150-04

限制性内切酶介导整合 (Restriction Enzyme-mediated Integration, REMI) 技术是在限制性内切酶介导下用质粒 DNA 转化真菌, 通过质粒的非同源整合使基因突变^[1], 从而直接获得基因标记, 并可通过 PCR 技术和质粒抢救等技术进行基因克隆和功能分析^[2-3], 从而探索功能基因间的相互作用和基因表达的调控机理。由于 REMI 插入是随机的, 木霉菌 REMI 突变株的各种特性的变化也是随机的, 因此研究对番茄灰霉病菌作用方式不同木霉菌 REMI 突变株的生物学特性的变化, 为后续分析 REMI 插入对木霉菌相关基因表达调控和提高木霉菌生防活性奠定基础, 同时研究木霉菌菌株的生物学特性也能够为优良菌株的发酵和生防剂型的研制提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

木霉菌出发菌株 T21 及作用方式不同木霉菌 REMI 突变株 (Ttrm25、Ttrm68、Ttrm31、Ttrm94), 其中 Ttrm68 能在灰霉病菌上生长; T21、Ttrm25 和 Ttrm31 不能在灰霉病菌上生长; Ttrm94 生长极慢, 和灰霉病菌无接触。

1.2 试验方法

1.2.1 作用方式不同木霉菌菌株的产孢能力

将木霉菌菌片转移到 PDA 培养基上, 于 28℃ 下培养 7 d 后, 用 10 mL 无菌水冲洗木霉菌分生孢子于试管中, 振荡使孢子悬浮液均匀, 适当调整其浓度后于血球计数板计数孢子的个数, 从而得到孢子悬浮液的浓度, 确定不同木霉菌的产孢能力。

1.2.2 作用方式不同木霉菌菌株的孢子萌发 将含有一定浓度葡萄糖的琼脂均匀地平铺在无菌的载玻片上, 待其凝固后将孢子悬浮液 (10³ 个/mL) 滴于上, 待水分蒸发后, 将载玻片放在含有水分的滤纸上, 于培养皿中 25℃ 下培养 12~15 h 后, 在显微镜下调查孢子的萌发情况。

1.2.3 作用方式不同木霉菌在不同温度下的生长 将木霉菌菌片移到 PDA 培养基中央, 然后将培养皿放在一定温度的培养箱中培养, 每隔 12 h 测量菌落半径。共设 10、15、20、25、30、35 和 40℃ 7 个温度梯度, 3 次重复。

1.2.4 pH 对作用方式不同木霉菌菌株生长及产孢的影响 将木霉菌菌片转入含有不同 pH 值 (2、4、6、8、10) PDA 培养液的三角瓶中, 每瓶放入直径 1.2 cm 的菌片 2 个。于摇床上 25℃、150 r/min 条件下培养 7 d 后, 观察菌丝的形态和在显微镜下观察孢子产生的种类与数量。

1.2.5 作用方式不同木霉菌菌株对碳氮源的利用能力 按照下列成分和含量制作基础培养基: 葡萄糖 20 g、天冬氨酸 2 g、KH₂PO₄ 1 g、MgSO₄ · 4H₂O 0.05 g、FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g、MnSO₄ · 4H₂O 3.2 mg、ZnSO₄ · 7H₂O 1.8 mg、琼脂 20 g、水 1 000 mL。不同碳源培养基分别用等量的蔗糖、淀粉、麦芽糖代替葡萄糖。将木霉菌菌片转移到培养皿中, 于 28℃ 下培养, 每

第一作者简介: 刘限 (1970-), 男, 河北滦南人, 博士, 副教授, 现主要从事病害的生物防治和分子生物学研究工作。E-mail: benz117309@sina.com.cn.

基金项目: 辽宁省博士科研启动资助项目 (20051051)。

收稿日期: 2011-06-09

隔 12 h 测量菌落半径。按照下列成分和含量制作基础培养基:葡萄糖 20 g、天冬氨酸 2 g、 KH_2PO_4 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3.2 mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.8 mg、琼脂 20 g、水 1 000 mL。不同氮源培养基分别用等量的蛋白胨、硝酸钠和尿素代替天冬氨酸。将木霉菌菌片转移到培养皿中,于 28℃ 下培养,每隔 12 h 测量菌落半径。

2 结果与分析

2.1 作用方式不同木霉菌菌株的产孢能力

由图 1 可看出,部分作用方式不同的木霉菌菌株间产孢能力有极显著差异。木霉菌菌株 Ttrm94 产孢数比其它木霉菌突变株和出发菌株 T21 的少一个数量级,达到极显著水平。木霉菌菌株 Ttrm25 产孢能力最高,极显著高于出发菌株 T21,而其它突变株的产孢能力基本上与出发菌株 T21 基本一致,Ttrm31 略高于出发菌株 T21,而 Ttrm68 则略低于出发菌株 T21,但均达到了 10^9 个/mL。

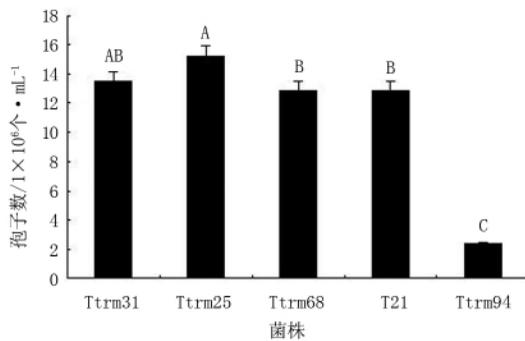


图 1 不同木霉菌菌株产孢能力

2.2 作用方式不同木霉菌菌株的孢子萌发

由图 2 可看出,不同木霉菌菌株的分生孢子萌发率有极显著的差异,菌株 Ttrm68 的萌发率最高,达到了 97%。极显著高于出发菌株 T21;菌株 Ttrm31 仅次于 Ttrm68 的萌发率,达到了 95%;而菌株 Ttrm25 的孢子萌发率与出发菌株 T21 基本一致;菌株 Ttrm94 孢子的萌发率仅为 78%,显著低于出发菌株 T21。

2.3 作用方式不同木霉菌菌株对温度的适应

由图 3 可看出,作用方式不同木霉菌菌株对温度的适应性改变很大。15℃ 时,菌株 Ttrm68 和 Ttrm31

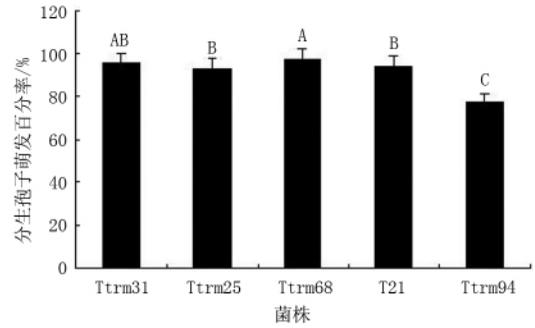


图 2 不同木霉菌菌株分生孢子的萌发

生长较快,生长快于野生菌株 T21;而菌株 Ttrm25 和 Ttrm94 生长慢,尤其是 Ttrm94 生长十分缓慢,明显低于野生菌株 T21 的生长速度;在 25~30℃ 范围内,生长比较快的是菌株 Ttrm31,其次为 Ttrm68。35℃ 时,生长比较快的是菌株 Ttrm68、Ttrm25,生长速度均大于野生菌株 T21;而菌株 Ttrm94 生长速度极为缓慢,显著低于野生菌株 T21 和其它几株木霉菌。由此可看出,作用方式不同的木霉菌 REMI 突变株对各种温度的适应性是不同的,菌株 Ttrm68 的温度生长适应范围较其它的菌株略宽,对低温和高温都有较强的适应性,在温度高达 40℃ 时仍能生长;而菌株 Ttrm25 也表现出耐高温的特性,在 35℃ 时生长速度较快;菌株 Ttrm94 则对温度得适应性和耐受力较差。

2.4 作用方式不同木霉菌菌株在不同 pH 值下培养性状和产孢的情况

由表 1 可看出,不同木霉菌菌株的培养颜色和形态随着 pH 变化而变化。随着 pH 的逐渐升高,培养液的颜色也由浅渐深,由灰白色逐渐转变为紫黑色,说明这些菌株在不同 pH 下会产生不同的色素。即使在相同的 pH 下,不同菌株也会产生不同色素。菌丝形态在酸性(pH=2)和碱性(pH=10)下为颗粒状,在二者之间的 pH 下,不同菌株的菌丝形态不同,有的是絮状菌丝,有的是颗粒状菌丝,有的是二者的混合体。由表 2 可以看出,不同菌株产生孢子的形态在不同 pH 条件下有所不同,pH 值越低木霉菌越容易产生厚垣孢子,pH 值越高木霉菌越容易产生分生孢子,说明低 pH 值容易使木霉菌产生抗逆性强的厚垣孢子,而高 pH 值容易使木霉菌产生分生孢子。菌株 Ttrm68 和野生菌株 T21 在 pH=8 的条件下仍能产生厚垣孢子。

表 1 作用方式不同木霉菌菌株在不同 pH 值下的培养性状

pH	T21	Ttrm31	Ttrm94	Ttrm25	Ttrm68
2	颗粒状,灰白色	颗粒状,灰白色	颗粒状,灰白色	颗粒状,灰白色	颗粒状,灰白色
4	絮状菌丝,浅灰绿色	絮状菌丝,灰中带红	颗粒,灰色	小颗粒,灰白色	絮状菌丝,灰绿色
6	颗粒,墨绿色	絮状菌丝+颗粒,黯灰色	絮状菌丝+颗粒,金黄色	颗粒,灰绿色	颗粒+絮状菌丝,绿色
8	颗粒,浅灰色略带红	颗粒,红褐色	絮状菌丝,黄褐色	颗粒,栗色	大颗粒,浅栗色
10	颗粒,紫黑色	颗粒,紫黑色	颗粒,深褐色	颗粒,紫黑色	颗粒,紫黑色

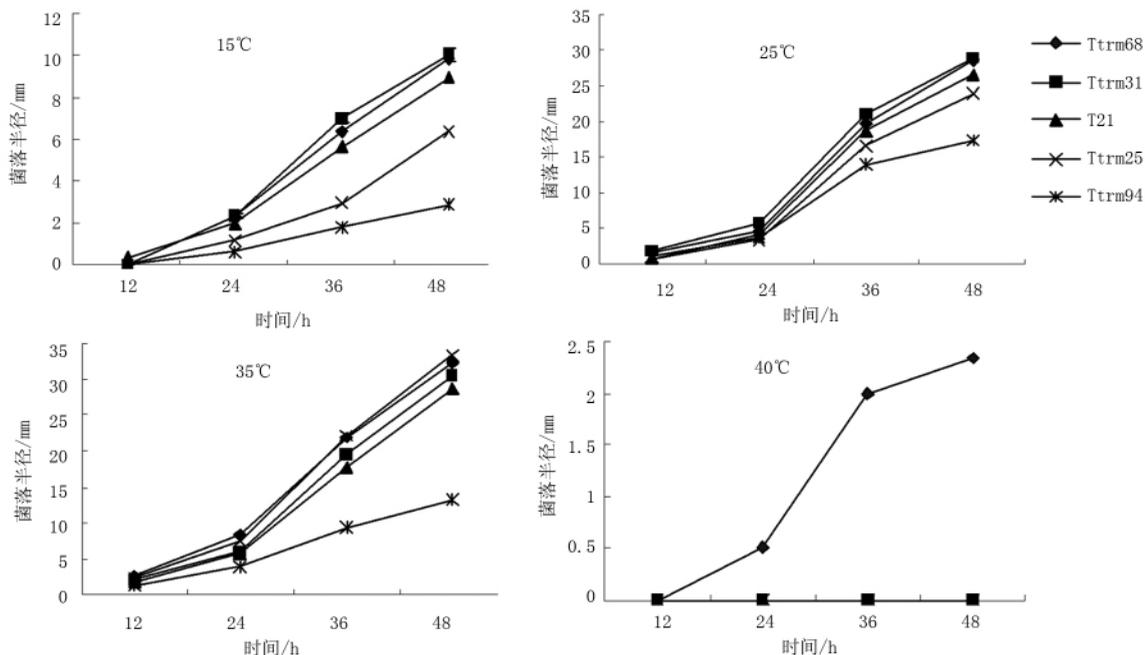


图3 温度对不同木霉菌菌株生长的影响

表2 作用方式不同木霉菌菌株在不同 pH 值下的产孢情况

pH	T21	Ttrm31	Ttrm94	Ttrm25	Ttrm68
2	◎++++	◎++++	◎+	◎+++	◎++++
4	◎++○+++	◎++○+++	◎++○+	◎+○+++	◎+++○+++
6	◎+○+++	◎+○+++	◎+○++	◎+○++++	◎++○++++
8	◎+○++++	◎++++	◎+++	◎+++	◎+○++++
10	○++++	○++++	○+++	○++++	○++++

注:◎—厚垣孢子;○—分生孢子;+ 极少量孢子;++ 少量孢子;+++ 较多孢子;++++ 大量孢子。

2.5 作用方式不同木霉菌菌株对不同碳氮源的利用能力

由图4可看出,不同木霉菌菌株对不同碳源的利用能力明显不同,Ttrm94在所有的碳源培养基上生长速度均为最慢。在葡萄糖为碳源的培养基上,出发菌株T21的生长速度最快;在麦芽糖为碳源的培养基上,菌株Ttrm31、Ttrm68和Ttrm25的生长速度均快于出发菌株T21;在淀粉为碳源的培养基上,在48h内菌株Ttrm68的生长速度明显快于其它菌株,Ttrm94的生长速度仍为最慢。在蔗糖为碳源的培养基上,Ttrm68的生长速度最快;Ttrm31和T21生长速度基本一致。

由图4还可看出,木霉菌REMI突变株对不同氮源的利用能力明显不同。木霉菌突变株Ttrm68对各种氮源均具有较高的利用率。在天冬氨酸为氮源的培养基上,菌株Ttrm68的生长速度最快;出发菌株T21快于Ttrm25、Ttrm31;Ttrm94生长速度为最慢。在以蛋白胨为氮源的培养基中菌株Ttrm68生长速度最快,Ttrm94生长速度较慢。在硝酸钠为氮源的培养基上菌株Ttrm68、Ttrm31生长速度较快,Ttrm94生长速度明显慢于其它菌株。

总体来说,菌株Ttrm68能够充分利用各种碳源,生长速度最快,麦芽糖为最佳碳源。Ttrm68对氮源的利用率明显高于其它菌株;Ttrm31和Ttrm25与出发菌株T21的利用能力相近;Ttrm94对氮源的利用能力极显著的低于其它菌株,最佳氮源为蛋白胨。

3 结论与讨论

在限制性内切酶介导下,外源质粒片段对染色体的插入是随机的,因此插入可能发生在无意义的序列、调控序列或阅读框架内的一个或几个识别位点上^[1]。一旦整合到调控序列或阅读框架序列上,由序列控制的相应性状将产生改变,从而获得的突变类型也是多种多样的^[4]。该试验结果表明,作用方式不同,木霉菌突变株的孢子萌发率、产孢能力、不同温度下生长速度、不同pH下产孢的类型和培养状态以及对碳氮源的利用情况都存在差异。对番茄灰霉病菌具有重寄生能力的木霉菌Ttrm68具有产孢量高、孢子萌发率高和抗逆强的特点,而对番茄灰霉病菌几乎无作用的Ttrm94产孢量最低、孢子萌发率最低,对高温的适应能力也不同,已报道的多数菌株在40℃一般停止生长^[5],而菌株Ttrm68仍能保持一定的生长存活能力,继续生长。这些研究结果为筛选高生防效果木霉菌提供了基本的依据,比如分生

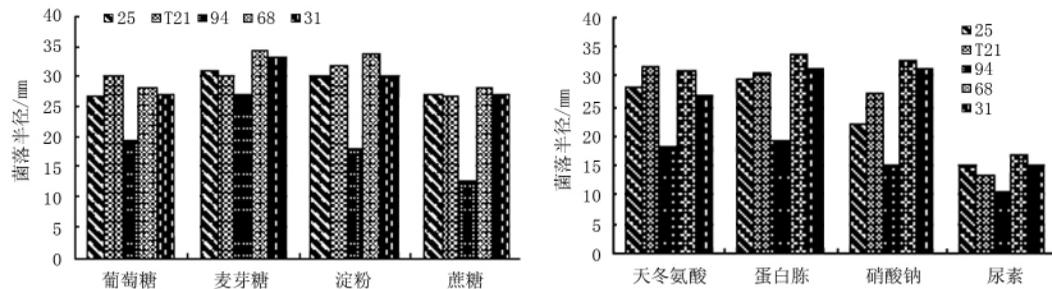


图4 作用方式不同木霉菌菌株对不同碳氮源的利用能力

孢子高萌发率对木霉菌发挥其生防效果起着重要的作用^[6]。此外,木霉菌突变株在不同 pH 下的菌丝形态、菌落色泽、产孢的方式等特征及对氮、碳源利用情况均存在明显差异,Trm68 和 Trm31 较为耐酸碱。尿素利于产孢但对木霉菌生长具有明显的抑制作用,王芊在对木霉菌株 BTW5 和 BTW41 的研究中也得到类似的结果^[7]。这一发现对今后指导生防木霉制剂合理使用具有重要意义。众所周知,尿素是保护地生产中常用氮肥,木霉菌在应用过程中必然会受到尿素的影响,也可能被尿素降解产物硝酸盐诱导变异,既降低了防效又增加了应用的风险性。因此,今后需要深入研究二者在保护地生产中的施用关系。

参考文献

[1] Schiestl R H, Petes T D. Integration of DNA fragments by

illegitimate recombination in *Aaccaromyces cerevisiae* [J]. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 7585-7589.

[2] Brown D H J, Slobodkin I V, Kumamoto C A. Stable transformation and regulated expression of an inducible reporter construct in *Candida albicans* using restriction enzyme-mediated integration [J]. Mol Gen Genet, 1996, 251: 75-80.

[3] Kosuke Takeda, Tamao Saito, Tomoyuki Tanaka, et al. A novel gene trap method using terminator-REMI and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) in *Dictyostelium* [J]. Gene, 2003, 312: 321-333.

[4] 刘树俊. 利用限制性内切酶诱导整合 (REMI) 获得稻瘟病菌突变体 [J]. 遗传学报, 1998, 5(3): 232-236.

[5] 李作森, 何月秋, 夏贤仁. 5 个木霉菌株的抑菌谱及部分生物学特性 [J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(3): 267-270.

[6] 朱茂山, 蔡忠杰, 关天舒, 等. 木霉菌 TrOI 菌株分生孢子萌发影响因素研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(5): 554-557.

[7] 王芊. 不同条件对木霉菌菌丝生长的影响 [J]. 中国农学通报, 2002, 18(5): 57-59.

Biological Characteristics of Different *Trichoderma* REMI Strains with Different Control to *Botrytis cinerea*

LIU Xian¹, HUANG Zhe¹, GAO Zeng-gui², ZHANG Xiao-min¹

(1. College of Bioscience and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: Original strain T21 and the different mode of action REMI mutants of *Trichoderma* were used as test material, biological characteristics of different *Trichoderma* strains including sporulation and its conidia germination, and the effect of different temperature, pH and nitrogen and carbon materials on *Trichoderma*'s growth were studied. The results showed that germination ratio of Trm68 was the highest, reached to 98%. The conidia yield of Trm25 was the highest, which was significantly higher than that of wild strain T21. There were some change on *Trichoderma* strains growth under different temperature and Trm68 showed the high-temperature resistance and could grow at 40°C. The culture and sporulation of different *Trichoderma* strains had some change under different pH and Trm68 and T21 could produce chlamydo-spore. There were great change on the utilization of different *Trichoderma* strains to different carbon and nitrogen materials. Trm68 could utilize all kinds of carbon and nitrogen materials and had a fast growth.

Key words: *Trichoderma* REMI strains; *Botrytis cinerea*; control; biological characteristics