

水稻纹枯病菌原生质体制备与再生条件的优化*

杨迎青 李明海 杨媚 李勇 周而勋**

华南农业大学资源环境学院, 广州 510642

摘要 为获得进行水稻纹枯病菌遗传转化所需的高质量原生质体, 选用该病菌强致病力菌株 GD-118, 分别从酶种类、菌龄、酶解时间、酶解温度、酶液 pH 值和渗透压稳定剂及其浓度 6 个方面优化了原生质体的制备条件, 从酶解时间和渗透压稳定剂及其浓度 2 个方面优化了原生质体的再生条件。结果表明: 优化后的水稻纹枯病菌原生质体制备的最佳条件组合是“纤维素酶+溶菌酶+崩溃酶”组合酶、总酶终质量浓度 10 mg/mL、菌龄 15 h、酶解时间 3 h、酶解温度 35 ℃、酶液 pH 5.6、以 0.6 mol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 为渗透压稳定剂, 此最佳条件组合所制备的原生质体产率高达 4.00×10^7 /g; 原生质体最佳的再生条件是酶解 3 h 的原生质体在含 1.0 mol/L 甘露醇的再生培养基上 26 ℃ 时进行培养, 在此条件下可获得最佳的再生效果, 再生率为 39%。

关键词 水稻纹枯病菌; 原生质体; 制备; 再生

中图分类号 S 435.111.4⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)05-0546-06

水稻纹枯病(rice sheath blight)是世界上重要的水稻病害之一, 其病原菌为立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)^[1]。由于该病原菌的寄主范围十分广泛, 因而在防治上非常困难^[2]。立枯丝核菌目前至少有 14 个融合群(anastomosis groups, AGs), 水稻纹枯病菌属于 AG-1 群 IA 亚群^[3-4]。长期以来, 国内外学者对水稻纹枯病进行了多方面的研究, 并取得了一些进展^[5-6], 但目前对该病菌的致病机制尚不清楚。通过对水稻纹枯病菌进行遗传转化, 构建病菌的突变体, 是探讨致病机制、克隆致病基因、寻求控制该病害的有效途径。病原菌原生质体的制备和再生是进行遗传转化的前提和关键。国内外学者对真菌的原生质体制备和再生已有较多的研究, 但由于不同真菌的细胞壁存在差异, 因而制备原生质体所用的酶和酶解条件等也不尽相同^[7-10]。在立枯丝核菌原生质体的制备和再生方面, 前人做过一些研究^[11-14], 笔者曾采用文献报道的方法制备水稻纹枯病菌的原生质体, 但效果并不理想。本试验中, 笔者选用广东省水稻纹枯病菌的强致病力菌株 GD-118, 对其原生质体的制备和再生条件进行了探索, 旨在摸清其原生质体制备和再生的最佳条件,

为水稻纹枯病菌遗传转化系统的建立和其致病相关基因的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂

供试菌株为水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn AG-1 IA)GD-118 菌株, 由华南农业大学热带亚热带真菌研究室保存, 并经测定为强致病力菌株。

供试 4 种酶: 纤维素酶(Cellulase), 上海伯奥生物科技有限公司产品; 溶菌酶(Lysozyme), 上海伯奥生物科技有限公司产品; 蜗牛酶(Snailase), 北京百泰生化技术公司产品; 崩溃酶(Driselase), 美国 Sigma 公司产品。

供试 4 种渗透压稳定剂: 山梨醇, 上海伯奥生物科技有限公司产品; 甘露醇, 上海伯奥生物科技有限公司产品; NaCl, 国药集团化学试剂有限公司产品; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 国药集团化学试剂有限公司产品。以上试剂及其他常用试剂均为国产分析纯。

1.2 培养基

供试基本培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)和马铃薯葡萄糖液体

收稿日期: 2010-02-26; 修回日期: 2010-04-12

* 国家 2007 年公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx3-16, 原 nyhyzx07-049)和教育部留学回国人员科研启动基金项目(教外司留[2006]331号)资助

** 通讯作者. E-mail: exzhou@scau.edu.cn

杨迎青, 男, 1981 年生, 博士研究生. 研究方向: 植物病原真菌学. E-mail: yyq8295@163.com

培养基(potato dextrose broth, PDB);再生固体培养基(regeneration solid medium, RSM)和再生液体培养基(regeneration liquid medium, RLM)是分别在PDA或PDB的基础上加入甘露醇而成,并使其浓度为1.0 mol/L。

1.3 原生质体的制备

1)酶液的配制。先配制0.1 mol/L pH 7.0的磷酸缓冲液。取适量配备好的磷酸缓冲液,加入 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,使 $MgSO_4$ 浓度为0.6 mol/L,作为渗透压稳定剂(OM),OM溶液的pH值在5.6左右。再用OM溶液配制各种酶溶液,使酶质量浓度均为10 mg/mL。待酶充分溶解后,以10 000 r/min离心5 min,取上清,经0.25 μm 微孔滤膜过滤除菌后,置于4 $^{\circ}C$ 保存备用。

2)菌丝体的准备。在PDA平板上,26 $^{\circ}C$ 下培养水稻纹枯病菌GD118菌株,36 h后,用5 mm打孔器在菌落边缘打取菌丝块,挑取4块菌丝块于盛有50 mL PDB的三角瓶中,26 $^{\circ}C$ 、150 r/min摇床振荡培养36 h后,用3层灭菌纱布过滤,收集菌丝体,再用灭菌研钵将其捣碎,转入盛有50 mL新PDB的三角瓶中,继续在相同条件下摇床振荡培养。捣碎的菌丝体培养15 h后,用3层灭菌纱布过滤,并用OM溶液冲洗3次,收集菌丝体备用。

3)原生质体的配制。将上述收集到的菌丝体在灭菌滤纸上吸干水分,称取1.0 g鲜菌丝,加入10 mL配制好的酶液,在35 $^{\circ}C$ 、77 r/min的摇床上振荡处理(酶解),30 min后,观察有无原生质体释放,以后每隔30 min观察1次,直到原生质体大量释放时(根据初步试验结果,一般为3 h左右),用4层擦镜纸过滤酶解液,去除菌丝碎片,收集酶解滤液,放入冰盒中,酶解滤液在7 000 r/min下离心10 min后去上清,沉淀即为原生质体,加入适量的OM溶液悬浮冲洗,再离心1次,去上清后用适量的OM溶解原生质体。

用血球计数板计数,并通过加入OM溶液量的多少来调节原生质体浓度,使原生质体浓度为 $10^7 \sim 10^8$ /mL,并立即使用,或加入甘油后置于-80 $^{\circ}C$ 冰箱保存备用。

1.4 原生质体制备的条件

1)酶种类及其组合。配制质量浓度为10 mg/mL的纤维素酶、溶菌酶、蜗牛酶和崩溃酶,然后按照等体积混合原则进行组合,共进行4种单一酶及2种酶组合、3种酶组合和4种酶组合共15种组

合处理。分别取每种酶液(单酶或混合酶)10 mL,各加入1.0 g鲜菌丝,进行酶解,制备原生质体。15种处理在同一试验中完成,以减少误差。在15种处理中,除酶种类不同外,其他试验条件均相同:菌丝菌龄15 h、以0.6 mol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 为渗透压稳定剂、酶解温度35 $^{\circ}C$ 、酶液pH 5.6、在77 r/min摇床上振荡酶解3 h。每处理重复3次,然后用血球计数板计数,分别计算原生质体产率(每g鲜菌丝产生的原生质体数量,以原生质体个数/g表示,下同)。

2)菌丝菌龄。设定5个菌龄(培养时间):9、12、15、18、21 h。除菌龄不同外,其他试验条件均与本文“1.4”中1)的条件相同。每处理重复3次,然后用血球计数板计数,分别计算原生质体产率。

3)酶解时间。设定5个酶解时间:1、2、3、4、5 h。除酶解时间不同外,其他试验条件均相同:3种酶组合“纤维素酶+溶菌酶+崩溃酶”、总酶的终质量浓度10 mg/mL、菌丝菌龄15 h、以0.6 mol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 为渗透压稳定剂、酶解温度35 $^{\circ}C$ 、酶液pH 5.6、在77 r/min摇床上振荡。在设定的5个时间点定时取样,每处理重复3次,然后用血球计数板计数,分别计算原生质体产率。

4)酶解温度。分别设定6个酶解温度:29、31、33、35、37、39 $^{\circ}C$ 。除酶解温度不同外,其他试验条件均与本文“1.4”中3)的条件相同。在设定的不同温度下酶解3 h。每处理重复3次,然后用血球计数板计数,分别计算原生质体产率。

5)酶液pH值。分别配制pH值5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0和6.2的0.1 mol/L柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,在缓冲液中加入 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 作渗透压稳定剂(OM),使 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的浓度为0.6 mol/L,然后再按上述酶液配制方法配制酶液。除酶液pH不同外,其他试验条件均与“1.4”中3)的条件相同。每处理重复3次,然后用血球计数板计数,分别计算原生质体产率。

6)渗透压稳定剂及其浓度。将4种供试渗透压稳定剂分别设定5个浓度:0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mol/L。除渗透压稳定剂及其浓度不同外,其他试验条件均与本文“1.4”中3)的条件相同。每处理重复3次,然后用血球计数板计数,分别计算原生质体产率。

1.5 原生质体的再生

将制备的原生质体分别在RLM和RSM培养

基上培养,在 RLM 培养基中培养的原生质体用于观察原生质体萌发情况,在 RSM 培养基上培养的原生质体用于计算再生率。

原生质体再生率计算:先在直径 9 cm 的培养皿中倒入 7 mL PDA,作再生培养基的下层;融化 RSM 培养基,冷却到 50 ℃左右,水浴锅中保温;将用 OM 系列稀释至浓度为 10^3 个/mL 的原生质体 100 μ L 加到 7 mL 50 ℃的 RSM 中,轻轻混匀,倒在上述 PDA 平板上,作上层;同时用灭菌水将原生质体进行系列稀释,使其浓度也为 10^3 个/mL,灭菌水中静置裂解 30 min,其余操作方法同上,以此作为对照(CK)(对照的菌落由少量未形成原生质体的菌丝片段形成)。

处理 3~4 d 后,统计每个平板上长出的菌落数,每种处理 3 次重复,取平均数,计算再生率。原生质体再生率计算公式:

$$\text{再生率}(\%) = \frac{\text{处理菌落平均数} - \text{CK 菌落平均数}}{\text{涂布原生质体数}} \times 100$$

1.6 原生质体再生的条件

1) 渗透压稳定剂及其浓度。设定山梨醇、甘露醇、NaCl 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 种渗透压稳定剂

(OM) 的 6 种浓度:0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mol/L,分别以这些 OM 溶液配制 RSM 培养基,用酶解 3 h 的原生质体进行再生试验。

处理 3~4 d 后,统计长出的菌落数,计算再生率,选出最佳的渗透压稳定剂及其浓度。

2) 酶解时间。分别取酶解 1、2、3、4、5 h 的原生质体,在用 1.0 mol/L 甘露醇配制的 RSM 培养基上进行再生试验。处理 3~4 d 后,统计长出的菌落数,计算再生率。

2 结果与分析

2.1 原生质体制备条件的优化

1) 酶种类及其组合。为筛选到理想的酶组合,选用 4 种常用酶及其组合进行试验,观察对原生质体产率的影响。试验结果表明,3 种酶组合(纤维素酶:溶菌酶:崩溃酶=1:1:1,总酶终质量浓度为 10 mg/mL)的酶解效果最佳,其产率最高可达 3.99×10^7 /g(表 1)。因此,以后的原生质体制备及再生条件优化试验采用此种酶组合。

表 1 酶种类及其组合对水稻纹枯病菌原生质体产率的影响

Table 1 Effects of enzymes and their combinations on the protoplast yields of *R. solani* AG-1 IA

酶 Enzyme	酶组合 Enzyme combination														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
纤维素酶 Cellulase	+				+	+	+				+	+	+		+
蜗牛酶 Snailase		+			+			+	+		+	+		+	+
溶菌酶 Lysozyme			+			+		+			+		+	+	+
崩溃酶 Driselase				+			+		+	+		+	+	+	+
产率 Yield ($\times 10^7$ /g)	1.16 ± 0.21 ef	1.14 ± 0.18 ef	1.28 ± 0.13 ef	0.81 ± 0.05 f	1.83 ± 0.18 ed	1.76 ± 0.30 ed	2.28 ± 0.04 cd	1.69 ± 0.67 ed	2.65 ± 1.03 cb	2.27 ± 0.99 cd	1.64 ± 0.10 edf	3.09 ± 0.26 b	3.99 ± 0.44 a	1.57 ± 0.24 edf	1.24 ± 0.21 ef

1) +: 表示有该酶 Presence of the enzyme; 表中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误,采用 DMRT 法进行差异显著性分析,数据后不同字母表示在 5% 水平上差异显著。Data in this table, representing the average ± SE of three replicates, were analyzed for significant difference by using DMRT, the data with the different letters are significantly difference at 5% level.

2) 菌丝菌龄。试验结果表明,菌丝菌龄对原生质体产率的影响很大。从培养 9 h 开始,随着菌丝菌龄增大,原生质体产率也增加,当菌龄为 15 h 时,产率达到最高峰,为 4.00×10^7 /g,之后产率开始下降。主要原因是随着菌丝菌龄增大,菌丝细胞开始老化,其活力下降,而且可能由于菌丝老化,菌丝细胞壁增厚,酶解效果较差,从而使原生质体产率下

降。因此,以培养 15 h 的菌丝体用于原生质体制备最为适宜。

3) 酶解时间。试验结果表明,在酶解前期,随着处理时间的延长,原生质体产率也随之增加,当酶解时间为 3 h 时,原生质体产率达到最大值,为 4.46×10^7 /g;随着酶解时间的延长,其产率下降。因此,原生质体制备的最适酶解时间为 3 h。

4)酶解温度。试验结果表明,随着酶解温度上升,原生质体的产率也不断上升,当酶解温度为 35 ℃时,原生质体的产率最高,为 $4.05 \times 10^7/g$,随后原生质体的产率开始下降,各温度之间的原生质体产率差异显著。因此,最适合于病菌的酶解温度为 35 ℃。

5)酶液 pH 值。试验结果表明,随着酶液 pH 值的增加,原生质体的产率也在增加,在 pH 5.6 时,原生质体产率达到最高峰,为 $3.85 \times 10^7/g$ 。此后,随着酶液 pH 值的增加,原生质体的产率下降。因此,制备原生质体时的最适酶液 pH 值为 5.6。

6)渗透压稳定剂浓度。试验结果表明,在低浓度阶段,随着渗透压稳定剂浓度的增加,原生质体的产率也在增加。当渗透压稳定剂 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的浓度为 0.6 mol/L,原生质体的产率达到最大值,达到 $4.31 \times 10^7/g$ 。此后,随着渗透压稳定剂浓度的增加,原生质体的产率下降。由此可见,在制备原生质体时,渗透压稳定剂浓度为 0.6 mol/L 时酶解效果最佳,浓度为 0.8 mol/L 时的酶解效果次之。

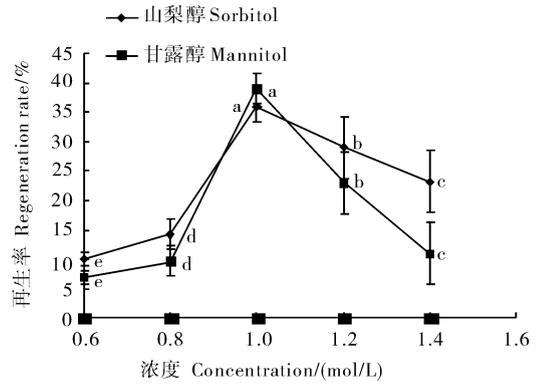
2.2 原生质体再生条件的优化

1)渗透压稳定剂及其浓度。试验结果表明,选用甘露醇和山梨醇作渗透压稳定剂,在 1 mol/L 的条件下,它们对原生质体再生的效果较好,再生率分别达到 39% 和 36%(图 1);而选用 NaCl 和 $MgSO_4$ 几乎再生不出菌落。由此可见,不同渗透压稳定剂及其浓度对原生质体再生率影响非常大。

2)酶解时间。试验结果表明,随着酶解时间的延长,原生质体再生率也随之降低,酶解 3 h 前原生质体再生率降低幅度较小,当酶解时间超过 3 h 后,原生质体再生率大幅度下降(图 2)。

3 讨论

影响真菌原生质体形成和再生的因素很多,以往对立枯丝核菌原生质体形成和再生的研究也只进行了部分影响因素的探索^[11-12,14]。本研究探讨了 6 种因素对立枯丝核菌(水稻纹枯病菌)原生质体形成和再生的影响,通过一系列试验,优化和组建出立枯丝核菌(水稻纹枯病菌)原生质体制备的最佳条件组为“纤维素酶+溶菌酶+崩溃酶”组合酶、总酶质量浓度 10 mg/mL、菌丝菌龄 15 h、酶解时间 3 h、酶解温度 35 ℃、酶液 pH 5.6、以 0.6 mol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 为渗透压稳定剂,此最佳条件组合所制备的原生质体产率高达 $4.00 \times 10^7/g$;原生质



图中数据为 3 次重复的平均值,采用 DMRT 法进行差异显著性分析,数据后具有不同字母者表示在 5% 水平上差异显著(图 2 同)。Data in this figure, representing the average of three replicates, were analyzed for significant difference by using DMRT, the data with the different letters are significantly difference at 5% level(the same as in Fig. 2).

图 1 渗透压稳定剂及其浓度对水稻纹枯病菌 AG-1 IA 原生质体再生的影响

Fig. 1 Effects of osmotic stabilizers and their concentrations on the regeneration rates of protoplasts from *R. solani* AG-1 IA

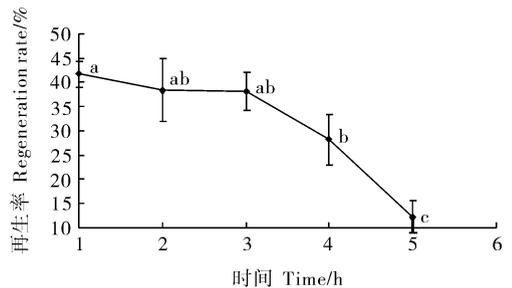


图 2 酶解时间对水稻纹枯病菌 AG-1 IA 原生质体再生的影响

Fig. 2 Effects of enzyme digest time on the regeneration rates of protoplasts from *R. solani* AG-1 IA

体最佳的再生条件是酶解 3 h 的原生质体在 1.0 mol/L 甘露醇再生培养基上 26 ℃时进行培养,在此条件下可获得最佳的再生效果,再生率达到 39%。

本试验采用组合酶总质量浓度为 10 mg/mL 的酶解体系,通过对 4 种酶进行一系列组合,筛选到了最佳酶组合,并得到了较高的原生质体产率。相比以往的研究结果^[11-12],本试验建立的方法酶用量小,原生质体产率高,再生效果好,是一种经济有效的方法。Robinson 等^[14]对 14 种单酶及 10 种组合酶的酶解效果进行了比较,发现 Novozyme 234 的酶解效果最优,并优于其研究中 10 种组合酶的酶解

效果。由于 Novozyme 234 价格较高,且需从国外进口,购买周期长,因而不适合国内使用。而本试验采用国内常用酶,摸索出了“纤维素酶+溶菌酶+崩溃酶”的最佳酶组合,每种酶的终质量浓度仅为 3.33 mg/mL,在大大降低成本的同时,也提高了原生质体产率,因而具有较高的应用价值。

在酶解时间方面,不同真菌略有差异^[9]。周庆新等^[7]在疏绵状嗜热丝孢菌原生质体的制备中酶解 4 h。本试验通过不同酶解时间内对原生质体产率的定量测定,发现 3 h 是立枯丝核菌原生质体制备的最佳时间,3 h 后原生质体的产率逐步下降,这与 Hashiba 等^[11]和张天晓等^[12]的研究结果存在较大差异。Hashiba 等^[11]和张天晓等^[12]认为 3 h 后原生质体的产率几乎保持稳定,存在差异的原因可能与采用的酶及菌丝菌龄、酶液 pH 值等因素有关。Robinson 等^[14]的研究结果表明,立枯丝核菌酶解时间以 2.5 h 较适宜,随后产率开始下降,到 3.5 h 时原生质体产率开始回升,本试验结果与之大致相同。但在本试验中,酶解 3 h 后原生质体产率一直下降,没有回升趋势。

在酶液 pH 值方面,不同真菌的适宜酶解 pH 值略有不同^[8]。由于 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 在水溶液中呈酸性,本试验用不同梯度 pH 值的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 0.6 mol/L 甘露醇溶液代替 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 作渗透压稳定剂,并用此溶液配制的“纤维素酶+溶菌酶+崩溃酶”组合酶进行酶解。结果表明,pH 5.6 是最适合立枯丝核菌细胞壁酶解和原生质体释放的。Hashiba 等^[11]在立枯丝核菌原生质体制备的研究中采用 pH 5.2 的酶解体系,张天晓等^[12]用 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、pH 5.6 的柠檬酸缓冲液配制酶液,由于 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 在水溶液中呈酸性,与柠檬酸混合后的 pH 值在 4.8 左右,所以 Hashiba 等^[11]和张天晓等^[12]采用的酶液 pH 体系与本试验得到的最佳酶液 pH 值略有差异。但在本试验中,pH 值为 5.0~5.2 时,也能得到 $1.50 \times 10^7 \sim 2.00 \times 10^7/g$ 的产率,且以 pH 5.6 的酶解效果最佳,产率达 $3.85 \times 10^7/g$ 。Robinson 等^[14]所用的是磷酸缓冲液,按其配方得到的酶液是高于 pH 5.6 的,且酶解体系中,磷酸盐缓冲液的 pH 值是 7.5,故加入 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 后的 pH 值高于 5.6。在本试验中,pH 值高于 5.6、低于 5.8 时,原生质体的产率降低没那么明显,pH 值为 5.8 时,原生质体的产率仍在 $3.00 \times 10^7/g$ 以上,但随着酶液 pH 值

继续升高原生质体产率大幅度降低。

在真菌原生质体制备试验中,一般认为指数生长期后期的菌丝是比较适合制备原生质体的。由于不同真菌的指数生长期不同,因而不同真菌制备原生质体的最佳菌龄各不相同^[11-12]。本试验通过设定不同梯度菌龄,观察对原生质体产率的影响,结果表明以 15 h 菌龄的水稻纹枯病菌的菌丝体制备原生质体是最适宜的。张天晓等^[12]采用的水稻纹枯病菌的菌丝菌龄是 12 h,与本试验结果略有差异。而 Hashiba 等^[11]则认为,60 h 菌龄的菌丝是最适合立枯丝核菌原生质体产生的,与本试验结果存在较大差异,这可能与试验所用的立枯丝核菌株属于不同的菌丝融合群有关。Hashiba 等^[11]试验采用的是立枯丝核菌 AG-3 融合群的菌株,而本试验采用的是立枯丝核菌 AG-1 融合群的菌株。

不同真菌在原生质体制备时酶解温度各异^[8]。本试验通过设定酶解温度梯度比较了各个温度对原生质体产率的影响,结果表明 35℃ 是立枯丝核菌原生质体制备的最佳酶解温度。这与 Hashiba 等^[11]采用的酶解温度(36℃)和张天晓等^[12]采用的酶解温度(35℃)基本一致,但与 Robinson 等^[14]采用的酶解温度(30℃)存在较大差异,这可能与试验所用的立枯丝核菌不同融合群有关。Robinson 等^[14]试验用的是立枯丝核菌 AG-3 融合群的菌株,而本试验用的是立枯丝核菌 AG-1 融合群的菌株。

在原生质体再生方面,朱宏莉等^[8]认为酶解时间对原生质体再生具有重要的作用,随酶解时间的延长,ZH-g 菌株原生质体再生率呈下降趋势,因此选用 2 h 为酶解的最佳时间。本试验对不同酶解时间的原生质体再生的影响进行了观察,结果表明随着酶解时间的延长,原生质体再生率也随之降低,酶解 3 h 前原生质体再生率降低幅度较小,当酶解时间超过 3 h 后,原生质体再生率大幅度下降。综合原生质体产率因素,本试验采用酶解 3 h 的原生质体进行再生和转化研究。

在渗透压稳定剂对立枯丝核菌原生质体再生的影响试验时,采用不同浓度的甘露醇、山梨醇、NaCl 和 $MgSO_4$ 进行再生,结果表明 1 mol/L 甘露醇或山梨醇作渗透压稳定剂时的再生效果较好,再生率分别达到 39% 和 36%,这个结果与 Robinson 等^[14]的研究结果基本一致。但本试验以 NaCl 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 作渗透压稳定剂进行再生时,几乎得不到再

生菌落,这与 Yang 等^[13]的研究结果有较大差异,其原因可能与所用的再生培养基不同有关。

参 考 文 献

- [1] LEE F N, RUSH M C. Rice sheath blight: a major rice disease [J]. *Plant Disease*, 1983, 67(7): 829-832.
- [2] 黄江华, 杨媚, 周而勋, 等. 13 种植物丝核菌对水稻、甜玉米、黄瓜和甘蓝的交互致病性[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(2): 198-203.
- [3] BETNARDES-DE-ASSIS J, STORARI M, ZALAJ, et al. Genetic structure of populations of the rice-infecting pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from China [J]. *Phytopathology*, 2009, 99(9): 1090-1099.
- [4] STODART B J, HARVEY P R, NEATES M, et al. Genetic variation and pathogenicity of anastomosis group 2 isolates of *Rhizoctonia solani* in Australia [J]. *Mycol Res*, 2007, 111: 891-900.
- [5] 周而勋, 杨媚, 陈友林. 土壤环境因素对水稻纹枯病菌腐生定殖能力的影响[J]. *植物病理学报*, 2002, 32(3): 214-218.
- [6] 黄世文, 王玲, 陈惠哲, 等. 氮肥施用量和施用方法对超级杂交稻纹枯病发生的影响[J]. *植物病理学报*, 2009, 39(1): 104-109.
- [7] 周庆新, 陈静, 于恺, 等. 疏绵状嗜热丝孢菌原生质体的制备与再生[J]. *菌物研究*, 2006, 4(2): 1-5.
- [8] 朱宏莉, 宋纪蓉, 张嘉, 等. 果胶酶产生菌 ZH-g 的原生质体形成与再生研究[J]. *食品科学*, 2006, 27(8): 68-71.
- [9] WAN Y, ZHANG D J, HUANG Y, et al. Establishment of protoplast transformation system in *Alternaria tenuissima* using G418 selection marker [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(3): 59-62, 98.
- [10] DE BEKKER C, WIEBENGA A, AGUILAR G, et al. An enzyme cocktail for efficient protoplast formation in *Aspergillus niger* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 76: 305-306.
- [11] HASHIBA T, YAMADA M. Formation and purification of protoplasts from *Rhizoctonia solani* [J]. *Phytopathology*, 1982, 72(7): 849-852.
- [12] 张天晓, 张志光. *Rhizoctonia solani* Kühn 原生质体制备和再生[J]. *湖南师范大学学报: 自然科学版*, 1988, 11(3): 251-255.
- [13] YANG H A, SIVASUTHAMPARAM K, O'BRIEN P A. Improved method for protoplast regeneration of *Rhizoctonia solani* [J]. *Soil Biol Biochem*, 1993, 25(5): 633-636.
- [14] ROBINSON H L, DEACON J W. Protoplast preparation and transient transformation of *Rhizoctonia solani* [J]. *Mycol Res*, 2001, 105(11): 1295-1303.

Optimized Conditions for the Preparation and Regeneration of Protoplasts from *Rhizoctonia solani* Kühn AG-1 IA

YANG Ying-qing LI Ming-hai YANG Mei LI Yong ZHOU Er-xun

College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract In order to obtain high quality protoplasts for the transformation of *Rhizoctonia solani* Kühn AG-1 IA, isolate GD-118 of this pathogen was used for the protoplast preparation and regeneration by optimizing the conditions in six aspects for the preparation of protoplast, including enzymes, mycelial ages, digest times, digest temperature, digest pH and osmotic stabilizers and their concentrations, and in two aspects for the regeneration of protoplast, including digest time and osmotic stabilizers together with their concentrations. The results showed that the best optimized combination conditions for the preparation of protoplast were “cellulase + lysozyme + driselase” at final total enzyme concentration of 10 mg/mL, 15 h of mycelial age, 3 h of digestion, 0.6 mol/L of MgSO₄ · 7H₂O as osmotic stabilizer, 35 °C of digest temperature and pH 5.6, which gave the protoplast yield as high as 4.00 × 10⁷/g fresh mycelia; whereas 3 h of digestion and 1.0 mol/L of mannitol were the best optimized conditions for the regeneration of protoplast in this study, and the regeneration rate was 39%.

Key words *Rhizoctonia solani* Kühn AG-1 IA; protoplast; preparation; regeneration