

## 不同虫生曲霉原生质体融合选育松墨天牛高毒力菌株

王国良, 王 勇

(浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100)

**摘 要:**采用紫外或加热方法分别对虫生曲霉天牛生葡萄曲霉(*Aspergillus vitis*)和叶甲生烟曲霉(*Aspergillus fumigatus* var *fumigatus*)的原生质体分别进行灭活,然后对灭活双亲用 PEG6000 作融合剂进行原生质体融合。将融合子第 2、第 4、第 6 和第 8 代的菌落和分生孢子梗特征进行比较后,选出 5 株生长速度快、生产孢子多的融合株进行胞外蛋白酶的检测和松墨天牛幼虫毒力测试。结果发现,融合株 U4-2 对松墨天牛幼虫的死亡百分率为 73.3%,和 2 个亲本相比较显著增强了毒力。

**关键词:**虫生曲霉;原生质体融合;高毒力菌株

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2010.02.23

中图分类号:S763.15 文献标识码:A 文章编号:1008-0864(2010)02-0128-05

### Screening for *Aspergillus* Strain with High Virulence to *Monochamus alternatus* by Protoplast Fusion

WANG Guo-liang, WANG Yong

(School of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli College, Zhejiang Ningbo 315100, China)

**Abstract:**The protoplasts of *Aspergillus vitis* on *Monochamus alternatus* and *Aspergillus fumigatus* var *fumigatus* on *Argopistes tsekooni* were inactivated by ultraviolet or heating method, respectively. Then protoplast fusion with PEG6000 as fluxing agent was conducted on them. The fusions were compared by colony and conidial characters, growth rate and sporulation of the 2nd, 4th, 6th and 8th generations. Five fusions with fast growth and more sporulation were selected for extracellular protease detection on gelatin agar plate. The results of *Monochamus alternatus* larvae toxicity test showed that the lethal rate of fusion U4-2 strains to *Monochamus alternatus* larvae was 73.3%. The virulence was significantly enhanced compared with the 2 parent strains.

**Key words:**entomogenous *Aspergillus*; protoplasts fusion; high virulence strain

微生物原生质体融合技术又称基因组改组技术,可打破生物分类界限,在不同种、不同属之间选择理想的融合株,遗传物质的传递更为完整,可获得性状优良的重组体,具有操作方便、明显减少后代筛选工作量、提高育种效率等优点<sup>[1~3]</sup>,在微生物遗传育种中的运用具有十分广阔的前景。

松墨天牛传播的松材线虫病是林业上最具危险性、毁灭性的病害之一,每年都造成巨大的经济损失。由于该病害发生危害的特殊性,目前仍然没有行之有效的防治方法。选育对松墨天牛幼虫有高毒力的微生物菌株是防治松材线虫病的有效方法之一<sup>[4,5]</sup>。

2007 年春对松墨天牛的调查发现,有 1 种曲霉寄生在松墨天牛幼虫上并可引起松墨天牛幼虫死亡。初步鉴定该曲霉的无性世代为葡萄曲霉(*Aspergillus vitis*),暂称天牛生葡萄曲霉。另外发现的一种女贞潜叶甲生曲霉能使大小猿叶虫幼虫和成虫发病死亡,也可使女贞潜叶甲生幼虫、菜青虫幼虫和斜纹夜蛾幼虫发病死亡,经初步鉴定为烟曲霉(*A. fumigatus* var *fumigatus*)<sup>[6]</sup>,暂称叶甲生烟曲霉。

本研究通过对天牛生葡萄曲霉和叶甲生烟曲霉原生质体进行融合,以期选育出对松墨天牛幼虫且有高毒力的菌株。

收稿日期:2009-11-02;修回日期:2010-01-08

基金项目:宁波市自然科学基金项目(2008A610071)资助。

作者简介:王国良,教授,主要从事植物保护研究。E-mail:wglzjwl@zwu.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

叶甲生烟曲霉(*A. fumigatus* var *fumigatus*)和天牛生葡萄曲霉(*A. vitis*)菌株,由本实验室分离保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 融合菌株的获得** 分别将叶甲生烟曲霉和天牛生葡萄曲霉两菌株活化,待其产生孢子后接种于马铃薯蔗糖液体培养基中,恒温摇床中 32℃、100 r/min 培养到形成大量菌丝球而没有产生孢子,其中天牛生葡萄曲霉培养 36 h,叶甲生烟曲霉培养 18 h。用接种环挑取菌丝球装入离心管中 1 400 r/min 离心 10 min,取出菌丝称重,加入菌丝重量 1.5 倍的 1% 酶液(蜗牛酶、纤维素酶和溶菌酶浓度分别为 0.3%、0.6% 和 0.1%)置于 28℃ 摇床中酶解 2.5 h。酶解后 6 000 r/min 离心 10 min,去上清后快速加入 0.6 mol/L NaCl 渗透压稳定剂。

叶甲生烟曲霉原生质体采用温度灭活:取 4 mL 原生质体悬液放入 10 mL 的离心管中,置于 55℃ 的水浴锅中水浴 50 min。

天牛生葡萄曲霉原生质体采用紫外灭活:取 4 mL 原生质体悬液置于离心管中,在 15 W 紫外灯(254 nm)下 30 cm 处灭活 2.5 h。

分别吸取两种不同方法灭活后的原生质体悬液各 0.5 mL 加入到离心管中混合,同时加入 0.6 mol/L 的甘露醇渗透压稳定剂以及 30% 的 PEG6000 4 mL 混匀迅速置于 30℃ 摇床中融合 10 min 后,6000 r/min 离心 20 min,去上清,加入 0.6 mol/L 甘露醇 4 mL,6 000 r/min 再次离心,弃 50% 的上清后震荡 3 min,吸取 0.5 mL 原生质体悬液涂布在 0.6 mol/L 甘露醇高渗再生培养基平板中,在 30℃ 恒温培养箱中黑暗培养。

在再生培养基平板上培养 2 d 后,挑取已形成菌落的边缘菌丝转移到马铃薯蔗糖固体培养基平板上进行传代培养并编号。以后每 2 d 传代 1 次,共传代 8 次。同时在传代后的第 2、第 4、第 6 和第 8 代原菌落顶部白色菌丝处斜插 2 块无菌盖玻片继续培养 2 d<sup>[7]</sup>,观察各菌株的菌落形态特

征和盖玻片上分生孢子梗形态特征。传代第 6~8 代的菌落形态特征稳定,从中挑选生长快、产孢多、同亲本有一定差异的 5 个菌株作为后续分析和测定用菌株。

**1.2.2 融合菌株胞外蛋白酶检测** 检测 5 个融合菌株(第 10 代)和 2 个亲本菌株的胞外蛋白酶,参照文献<sup>[8,9]</sup> 试验方法。

**1.2.3 融合菌株毒力测定** 11 月下旬从发生松材线虫病枯死的松树中劈取松墨天牛越冬幼虫,观察 5 d 后,挑选无伤口的活动正常的幼虫作为试验用虫。分别喷雾各菌株(融合菌株第 10 代)的分生孢子悬浮液(浓度  $6 \sim 7 \times 10^8$ /mL),喷雾止幼虫滴水,晾干后每条幼虫放入 2 mL 离心管中 20℃ 饲养。每处理 10 头幼虫,重复 3 次。每天观察记录一次幼虫的生长情况,15 d 后统计死亡百分率。

## 2 结果与分析

### 2.1 融合再生后代培养特征

融合体在再生培养基上培养 2 d 后共形成 9 个菌落。传代培养 4 d 后观察各菌株的菌落形态特征和斜插盖玻片上分生孢子梗形态特征发现,同亲本相比,多数菌株有明显的变化。

菌落色泽变化不大,多数为黄绿色(中间绿色外面黄色)或黄色,但 U2 菌株菌落的色泽为黑色。

各融合体菌落形状和大小变化很大。U3 菌株菌落形状为扇形(大约 1/4 菌落的菌丝生长十分缓慢)。有 5 个菌株菌落边缘的白色菌丝生长快,但是生长不同步,呈大波浪状。

天牛生曲霉分生孢子梗头部特征为短柱状,叶甲生曲霉是球形,U4-1、U4-2 和 U4-3 同时有短柱状和球形(见图 1-A)。曲霉亲本的分生孢子梗茎表面有光滑和粗糙的区别,均不生长其他东西,但 U1-1、U4-2 和 U4-3 的分生孢子梗茎上直接产生瓶梗和分生孢子(图 1-B)或在分生孢子梗茎顶部形成正常的分生孢子头和瓶梗、分生孢子,在其茎中部产生瓶梗和分生孢子(图 1-C)。

各菌株第二代菌落和分生孢子梗主要形态特征见表 1。



图1 分生孢子梗头特征

Fig.1 Conidial head characteristics.

A. 短柱状或球形的分子孢子梗头; B. 分生孢子梗茎上产生瓶梗和分生孢子; C. 分生孢子梗头和分生孢子梗茎上的瓶梗和分生孢子.

A. Short columnar or spherical conidial head; B. Phialide & conidium on conidiophore stipe; C. Conidial head and phialide & conidium on conidiophore stipe.

表1 各菌株第2代菌落和分生孢子梗形态特征

Table 1 The colony and conidiophore characteristics of second-generation strains.

菌株 Conidiation	菌落 Colony			分生孢子梗 Conidiophore		
	形状 Shape	大小(mm) Size(mm)	色泽 Color	产孢 Conidiation	头部 Head	梗茎 Conidiophore stipe
U1-1	顶部波状 Top wave	27	黄绿色 Yellow-green	丰富 Rich	球形 Spherical	畸形、生瓶梗 Deformity, resulting in phialide
U1-2	顶部波状 Top wave	26	黄绿色 Yellow-green	丰富 Rich	球形 Spherical	光滑 Smooth
U2	圆形 Round	28	黑色 Black	丰富 Rich	短柱状 Short column	光滑 Smooth
U3	扇形 Fan	20	黄色 Yellow	少量 Bit	球形 Spherical	光滑 Smooth
U4-1	顶部波状 Top wave	28	黄绿色 Yellow-green	丰富 Rich	球形和短柱状 Spherical & short column	光滑 Smooth
U4-2	顶部波状 Top wave	28	黄绿色 Yellow-green	丰富 Rich	球形和短柱状 Spherical & short column	畸形、生瓶梗 Deformity, resulting in phialide
U4-3	顶部波状 Top wave	25	黄绿色 Yellow-green	丰富 Rich	球形和短柱状 Spherical & short column	畸形、生瓶梗 Deformity, resulting in phialide
U5	圆形 Round	16	黄色 Yellow	少量 Bit	球形 Spherical	光滑 Smooth
U6	圆形 Round	25	黄绿色 Yellow-green	丰富 Rich	球形 Spherical	光滑 Smooth
天牛生曲霉 <i>Mal</i> *	圆形 Round	22	黄绿色 Yellow-green	丰富 Rich	短柱状 Short column	光滑 Smooth
叶甲生曲霉 <i>Afu</i> **	圆形 Round	24	黄绿色 Yellow-green	丰富 Rich	球形 Spherical	光滑 Smooth

\* *Aspergillus vitiis* on *Monochamus alternatus*.

\*\* *Aspergillus fumigatus* var *fumigatus* on *Argopistes tsekooni*.

以上结果表明,融合杂交后代在菌落和分生孢子梗形态特征方面的多种变异是由于2种不同种曲霉的不亲和性和它们的原生质体经过紫外灭活、温度灭活后形起的基因突变等原因所产生的综合表现,同时也表明有了选择优良目的菌株的可能性。

各菌株第4代菌落和分生孢子梗主要形态特征为:菌落大小、颜色、产孢情况同第2代基本相同,菌落形状有一定变化,U3的扇形菌落已成为椭圆形,第2代菌落顶部波状的5个菌株的菌落基本为圆形,同亲本相比边缘仍然不整齐。分生孢子梗头部仍然同第2代相同,分生孢子基部畸形菌株的分生孢子梗茎上直接产生瓶梗和分生孢子的现象只在U1-1见到1个。

各菌株第6、第8代菌落和分生孢子梗主要形态特征同第4代菌落相比变化不大。U3的菌落仍成为椭圆形,生长慢,产孢很少,U5生长慢,产孢仍然很少。U2的分生孢子头经压片检查发

现它的产孢结构是双层结构,初步鉴定是黑曲霉。分生孢子基部畸形菌株的分生孢子梗茎畸形现象从第6代起没有见到。

挑选传代第6~8代菌落形态特征稳定的,生长快、产孢多、同亲本有一定差异的5个菌株U1-1、U1-2、U4-1、U4-2、U4-3和2个亲本作为进一步分析和测定用菌株。

## 2.2 融合菌株胞外蛋白酶检测

5个第10代融合菌株和2个亲本的胞外蛋白酶检测结果见表2。

同亲本相比较,5个融合菌株中有3个的透明圈比值显著增加,其中U4-2和U4-3的透明圈比值有极显著增加,表明他们的胞外蛋白酶分泌能力极显著增加。

## 2.3 融合菌株对松墨天牛越冬幼虫死亡率测定

5个第10代融合菌株和2个亲本对松墨天牛越冬幼虫的死亡率测定结果见表3。

表2 菌株透明圈与菌落直径比值和 Duncan 多重比较

Table 2 Diameter ratio of transparent circle and colony of strains and the Duncan multiple comparison.

菌株 Strain	天牛生曲霉 <i>Mal</i> *	叶甲生曲霉 <i>Afu</i> **	U4-3	U4-1	U4-2	U1-1	U1-2
菌落直径(mm) Colony diameter(mm)	7.31	8.33	7.00	6.50	6.83	6.3	6.00
透明圈直径(mm) Transparent circle diameter(mm)	9.50	10.83	13.67	9.67	14.17	10.00	7.17
比值 Ratio	1.26B	1.29B	1.95A	1.57B	2.07A	1.47B	1.25
离均差 SE	0.056	0.042	0.081	0.106	0.070	0.323	0.080SE

1. \* *Aspergillus vitis* on *Monochamus alternatus*; \*\* *Aspergillus fumigatus* var *fumigatus* on *Argopistes tsekooni*;

2. 不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。Different capital letters indicate very significant difference( $P < 0.01$ )

表3 各菌株对松墨天牛虫幼虫死亡百分率

Table 3 Death rate of strains to larvae of *Monochamus alternatus*.

菌株 Strain	供试虫数(头) Tested insects number (head)	死亡虫数(头) Dead insects number (head)	死亡率(%) Death rate (%)	校正死亡率(%) Corrected mortality (%)
U4-2	10、10、10	7、7、8	73.3A	66.7
U4-3	10、10、10	6、6、7	63.3AB	56.7
U4-1	10、10、10	5、6、7	60.0ABC	53.3
U1-1	10、10、10	6、6、6	60.0ABC	53.3
天牛生 <i>Mal</i> *	10、10、10	6、5、5	53.3BCD	46.6
叶甲生 <i>Afu</i> *	10、10、10	4、5、4	43.3CD	36.6
U1-2	10、10、10	5、3、4	40.0D	33.3
对照 Control	10、10、10	1、1、0	6.7E	—

1. \* *Aspergillus vitis* on *Monochamus alternatus*; \*\* *Aspergillus fumigatus* var *fumigatus* on *Argopistes tsekooni*;

2. 不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。Different capital letters indicate very significant difference( $P < 0.01$ )

同亲本天牛生曲霉相比较,融合菌株 U4-2 对松墨天牛虫幼虫死亡百分率 73.3%,比天牛生曲霉增加 37.5%,有极显著差异,其他融合菌株没有显著差异。同亲本叶甲生相比较,融合菌株 U4-2、U4-3 有极显著差异,对松墨天牛虫幼虫死亡百分率分别增加 69.3% 和 46.2%。

将表 4 中各菌株的死亡百分率与表 2 中各菌株的透明圈直径与菌落直径的比值作一回归分析得到:

$$y = -5.2357x + 77.114, R^2 = 0.9488$$

表明二者之间有好的相关性。

### 3 讨论

本研究采用紫外灭活、加热灭活两种不同的方法对 2 种虫生曲霉的双亲株原生质体进行灭活,由于致死损伤部位存在差异,更有利于双亲株的互补,同李佳玮等<sup>[10]</sup>的结果相同。

融合菌株第 2 代菌株 U4-1、U4-2 和 U4-3 分生孢子梗头部同时有短柱状和球形。U1-1、U4-2 和 U4-3 的分生孢子梗茎上直接产生瓶梗和分生孢子或在分生孢子梗茎顶部形成正常的分生孢子头和瓶梗、分生孢子,在其茎中部产生瓶梗和分生孢子,表明这些融合菌株在形态特征方面有了很大的变异。本实验表明用观察放线菌形态特征的插玻片法<sup>[7]</sup>观察融合菌株早期后代形态特征的变异,有利于进行融合菌株的早期鉴定

在昆虫病原真菌的研究中,毒力测定是评价菌种(株)是否具有应用潜力的基础。毒力一般用生物测定来评价,相当费时费力,所以国内外一直有人尝试通过生化方法即酶活性的测定来筛选强毒菌,蛋白酶活性与毒力之间关系的研究报道结果不一致<sup>[11~13]</sup>。冯明光<sup>[13]</sup>的深入研究表明各菌株胞外蛋白酶活性与其毒力相关显著,但脂酶活性却与毒力相关不显著,因此蛋白酶活性可作为大量菌株初筛的参考性毒力指标,但应谨慎使用,不能以蛋白酶活性测定完全取代常规的毒力测定。本研究采用蛋白酶活性初筛和松墨天牛虫

幼虫毒力测定相结合的方法,第 10 代融合菌株 U4-2 和 U4-3 的透明圈试验结果表明它们的透明圈比值分别为 2.07 和 1.95,而 2 个亲本的透明圈比值只有 1.29、1.26,相比之下有极显著增加,表明他们的胞外蛋白酶分泌能力极显著增加。融合菌株 U4-2 对松墨天牛虫幼虫死亡百分率为 73.3%,比 2 个亲本 53.3% 和 43.3% 有极显著增加。

物理、化学诱变选育优良菌株常需要从几百个诱变菌株中选择目标菌株,而通常的原生质体融合首先要使双亲株获得稳定遗传标记和选择培养基,相比之下,原生质体双亲灭活是一种有利于选择重组融合子,提高筛选效率的方法。

### 参 考 文 献

- [1] 刘祖同,罗信昌. 食用蕈菌生物技术及应用[M]. 北京:清华大学出版社,2002,73.
- [2] 罗雯,陈志勤. 微生物原生质体融合技术及其在育种中的应用[J]. 西安联合大学学报,2003,6(4):5-9.
- [3] 孙剑秋,周东坡,平文祥. 灭活微生物原生质体融合的研究进展[J]. 中国医学生物技术应用杂志,2002,2:29-32.
- [4] 马良进,杨毅,张立钦. 松墨天牛寄生白僵菌的优良菌株筛选[J]. 北林业大学学报,2006,5:4-9.
- [5] 齐祖同主编. 中国真菌志(第五卷). 曲霉属及其相关有性型[M]. 北京:科学出版社,1997,1-254.
- [6] 王国良. 叶甲生烟曲霉的初步研究[J]. 中国生物防治,2006,22(增刊):28-32.
- [7] 钱存柔,黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京:北京大学出版社,1999,24-25.
- [8] 王国良. 对小猿叶甲高毒力烟曲霉菌株的选育技术[J]. 中国生物防治,2008,2:182-185.
- [9] Bidochka M J, Khachatourians G G. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular proteases as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* [J]. J. Inver. Pathol., 1990,56:362-370.
- [10] 李佳玮,张文琴. 双亲灭活原生质体融合法选育阿维菌素高产菌株[J]. 沈阳药科大学学报,2006,23(5):320-323.
- [11] 施宠,付建红,王纯利. 绿僵菌高毒力菌株的选育[J]. 新疆农业科学,2004,41(5):308-311.
- [12] 徐均焕,冯明光,许谦. 昆虫病原真菌胞外蛋白酶的病理作用与测定技术[J]. 中国生物防治 1998,14(3):123-129.
- [13] 冯明光. 胞外蛋白酶和脂酶活性作为球孢白僵菌毒力指标的可靠性分析[J]. 微生物学报 1998,38(6):461-467.