

# 玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)原生质体的分离及转化

周永力<sup>1\*</sup> TANAKA Chihiro<sup>2</sup> MATSUSHIMA Satoshi<sup>2</sup> TSUDA Mitsuya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( 中国农业科学院作物育种栽培研究所农业部作物遗传育种重点开放实验室 北京 100081 )

<sup>2</sup>( 京都大学环境微生物实验室 京都 606-8502 )

**摘 要** 玉米大斑病是严重危害玉米生产的一个世界性真菌病害。由于玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)在无性生长过程中迅速产生黑色素,致使原生质体难以分离。测试了包括 Fungase、Fungelase、Novozyme、Glucanex、Driselase、Uskizyme、Kitalase 在内的 7 种细胞壁降解酶及其组合、病原菌菌株和培养基对原生质体分离效果的影响。结果表明菌株的培养形态和菌丝的生长状态显著影响原生质体的分离效率,酶组合 Kitalase + Glucanex + Driselase, Kitalase + Glucanex 和 Kitalase + Uskizyme 能够有效地分离玉米大斑病菌的原生质体。初步的转化试验表明,质粒 pAN71 可以用于该病原菌的转化。这些结果将为 *E. turcicum* 和 *Exserohilum* 属其它真菌的基因克隆提供一些有用的信息。

**关键词** *Exserohilum turcicum* 原生质体,提取,转化

中图分类号 Q93 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0364-04

*Exserohilum turcicum*( Passerini )Leonard et Suggs 是引起玉米大斑病的一种丝状病原真菌。玉米大斑病是威胁玉米生产的一个重要的真菌病害,在世界的主要玉米产区都造成很大经济损失<sup>[1-3]</sup>。目前有关玉米病原菌的报道主要涉及生理小种的分化<sup>[4-6]</sup>、变异<sup>[7]</sup>及其产生的毒素<sup>[8,9]</sup>。了解病原菌与寄主的分子作用机理是发展新的防治策略的基础。近年来,以原生质体为受体,建立了几种有效的丝状菌转化系统<sup>[10]</sup>,采用插入突变策略,成功地克隆了几种病原菌的基因,如 *Magnaporthe grisea* 分生孢子基因、*Ustilago maydis* 和 *M. grisea* 致病相关基因<sup>[11-13]</sup>。*E. turcicum* 在无性生长过程中产生黑色素,菌丝迅速老化,致使原生质体难以分离。迄今尚无 *E. turcicum* 原生质体分离和转化的报道,基因克隆一直受到限制。本文研究了影响 *E. turcicum* 原生质体分离的主要因素,并在此基础上进行了初步的原生质体转化试验。

## 1 材料与方法

### 1.1 *E. turcicum* 菌株和培养基

5 个经多次单孢分离、直至培养性状稳定的菌株 MY, DQ, GG, CBⅢ 和 CBⅠ-2 用于原生质体分离试验。采用的培养基为:CM[ (g/L): 1.5 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.5 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 KCl, 0.03 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 tryptone, 1 yeast extract, 10 glucose ]; V<sub>8</sub>( 180mL V<sub>8</sub> juice 加入 2g CaCO<sub>3</sub> 离心取上清液 ); V<sub>8</sub>TY( 1g tryptone, 1g yeast extract /1000mL V<sub>8</sub> 上清液 )和 P1X( 200g 马铃薯

薯煮制的汁液, 10g glucose/L )。

### 1.2 原生质体的提取

所用的细胞壁降解酶包括 4 种 1,3-glucanase :Fungase ( Nagase Biochemical ), Fungelase( Yakult Honsha ), Novozyme ( Novo Nordisk, Denmark ), Glucanex( Novo Nordisk, Denmark ), 和 3 种  $\beta$ -glucuronidase :Driselase( Kyowa Hakko ), Uskizyme ( Wako Junyaku ), Kitalase( Wako Junyaku )。将供试菌株接种于 3mL 液体培养基中,于 25℃、200r/min 振荡培养 16~24h,切断菌体并将其转接于 30mL 液体培养基中振荡培养 18~24h,离心收集菌体。用灭菌的渗透压稳定剂( Osmotic stabilizer ) ( 0.7mol/L, 0.1mmol/L CaCl<sub>2</sub> )洗 2 次,将菌体溶于 2 倍体积的渗透压稳定剂中,加入细胞壁降解酶或细胞壁降解酶组合,使其终浓度分别为 10、20 和 40mg/mL。于 28℃振荡酶解 1~3h 后,用 20 $\mu$ m 孔径的滤膜过滤经酶解处理的菌体,取滤液,用血球计数板计算原生质体的浓度。当用于转化时,离心收集原生质体,用 STC 缓冲液( 1.2mol/L Sorbitol, 10mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub> )洗 2 次,将浓度调整至 1×10<sup>8</sup> 个/mL 备用。

### 1.3 质粒和转化

菌株 CBⅢ 用作转化的受体。供试质粒为 pAN71, pCB1004 和 pHPT31。pAN71 是 pUC18 的 6.5kb 衍生物,带有来自 *E. coli* 的 hygromycin B phosphate dehydrogenase 基因和来自 *Aspergillus nidulance* 的 glyceraldehyde 3-phosphate dehydroge-

nase 基因启动子<sup>[14]</sup>。pCB1004、pHPT311 与 pAN71 相似 启动子不同 ,分别为 *A. nidulans* 的 triptophan synthase 基因启动子和 *Neurospora crassa* 的 histidinol dehydrogenase 基因启动子。按照修改的 Vollmer 和 Yanfsky 方法<sup>[15]</sup>进行转化。将 30μg (50μL 环状质粒 DNA 与 100μL *E. turcicum* 原生质体混合(浓度为 10<sup>8</sup> 个/mL);同时 ,将 30μg 环状质粒 DNA 经 *Hind*Ⅲ 酶切、纯化 ,分别加入 20、50、100 u 的 *Hind*Ⅲ 和相应的内切酶缓冲液 ,使其总体积为 50μL ,与 100μL 原生质体混合。将 *E. turcicum* 原生质体与环状质粒 DNA 或线性质粒(和相应的限制性内切酶)的混合物在室温下放置 10min ,逐滴加入 1mL 的 PEQ[60% (W/V)polyethylene glycol in STC ,pH 7.5] ,室温下放置 20min ,3500r/min 离心 5min 收集原生质体。将原生质体悬浮于 300μL STC 中 ,与 10mL 再生培养基[(g/L):1 tryptone ,1 yeast extract ,10 sucrose ,15 agar]混合倒于培养皿中。原生质体萌发后加入 10mL 含有 100μg/mL hygromycin B 的选择培养基((g/L):1 tryptone ,1 yeast extract ,15 agar) ,挑取抗性转化体的菌丝顶端转到含有 80μg/mL hygromycin B 的 CM 平板上进一步筛选 ,重复筛选 3 次。

将随机挑取的转化体转接于 3mL 液体 CM 培养基中 ,振荡培养 24~48h ,离心收集菌体 ,采用 Nakata 等人的方法<sup>[16]</sup>提取 DNA ,以 hygromycin B phosphate dehydrogenase 基因编码区的序列 5' CCGTCAACCAAGCTCTGATAGAG 3'(HPT630)和 5'

AATCGGTCAATACACTACATGGCG 3'(HPT1030)为引物 ,进行 PCR 检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞壁降解酶及其组合对 *E. turcicum* 细胞壁的降解效果

不同的细胞壁降解酶对 *E. turcicum* 不同菌株细胞壁的降解效果显著不同。供试的 7 种酶对 MY、DQ、GG、CBⅢ 和 CBⅠ-2 等 5 个菌株的处理结果表明 ,只有 Kitalase 较有效地降解菌株 CBⅢ 的细胞壁 ,原生质体浓度达到 5.75×10<sup>6</sup>~7.93×10<sup>6</sup> 个/mL。其它 6 种酶对各菌株的细胞壁均无显著的降解作用 ,所分离的原生质浓度为 0~2.4×10<sup>4</sup> 个/mL。

在表 1 所列的酶组合中 ,K+G+D 效率最高(酶的缩写见表 1) ,其次为 K+G ,K+U 和 K+G+U。菌株 CBⅢ 经上述 3 种酶组合处理所分离的原生质体足以用于转化。与单一酶的降解效果相同 ,供试的各酶组合对 MY 等 4 个菌株的细胞壁没有显著的降解作用。在 CM 培养基上 ,菌株 MY ,DQ 和 GG 黑色素迅速产生、沉积 ,菌丝很快老化 ,菌落呈墨绿色 ;CBⅠ-2 气生菌丝生长旺盛 ,菌落呈灰黑色 ;CBⅢ 气生菌丝较少 ,菌落呈淡绿色。可见菌株的生长特性是影响其原生质体分离效率的一个重要因素。

表 1 酶组合对 *E. turcicum* 原生质体的分离效率的影响  
Table 1 Effect of enzyme combination on the isolation frequency of protoplast in *E. turcicum*

Enzyme combination *	Strain				
	MY	DQ	GG	CBⅢ	CBⅠ-2
K + Fg	1 × 10 <sup>4</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>	7 × 10 <sup>4</sup>	9.2 × 10 <sup>5</sup>	4.8 × 10 <sup>5</sup>
K + N	0	0	1 × 10 <sup>4</sup>	1.46 × 10 <sup>6</sup>	2 × 10 <sup>4</sup>
K + G	0	1.55 × 10 <sup>6</sup>	1.2 × 10 <sup>5</sup>	1.065 × 10 <sup>7</sup>	1.3 × 10 <sup>5</sup>
K + U	0	4 × 10 <sup>4</sup>	1.1 × 10 <sup>5</sup>	5.83 × 10 <sup>6</sup>	4 × 10 <sup>4</sup>
K + Fc	0	2.2 × 10 <sup>5</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>	4.5 × 10 <sup>6</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>
K + D	4.4 × 10 <sup>5</sup>	3.2 × 10 <sup>5</sup>	1.2 × 10 <sup>5</sup>	1.52 × 10 <sup>6</sup>	7 × 10 <sup>4</sup>
D + Fg	0	3 × 10 <sup>4</sup>	1.0 × 10 <sup>5</sup>	2.4 × 10 <sup>5</sup>	3.5 × 10 <sup>5</sup>
D + N	0	1 × 10 <sup>4</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>	8 × 10 <sup>4</sup>	4.3 × 10 <sup>5</sup>
D + G	0	0	8 × 10 <sup>4</sup>	2.8 × 10 <sup>5</sup>	2.6 × 10 <sup>5</sup>
D + U	0	0	4 × 10 <sup>4</sup>	3.2 × 10 <sup>5</sup>	1.1 × 10 <sup>5</sup>
D + Fc	0	04	0	6 × 10 <sup>4</sup>	3 × 10 <sup>4</sup>
U + Fg	0	0	0	3 × 10 <sup>4</sup>	4 × 10 <sup>4</sup>
U + N	0	0	0	0	2 × 10 <sup>4</sup>
U + G	0	1 × 10 <sup>4</sup>	0	0	2.7 × 10 <sup>5</sup>
U + Fc	0	0	0	0	2.2 × 10 <sup>5</sup>
K + Fg + N	0	0	1.0 × 10 <sup>5</sup>	3.6 × 10 <sup>5</sup>	0
K + Fg + G	0	3 × 10 <sup>4</sup>	1.2 × 10 <sup>5</sup>	4.2 × 10 <sup>5</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>
K + Fg + U	8.3 × 10 <sup>5</sup>	1.0 × 10 <sup>5</sup>	1.8 × 10 <sup>5</sup>	7.1 × 10 <sup>5</sup>	4.5 × 10 <sup>5</sup>
K + Fg + Fc	2	5.3 × 10 <sup>5</sup>	9 × 10 <sup>4</sup>	1.72 × 10 <sup>6</sup>	4.4 × 10 <sup>5</sup>
K + N + G	0	0	3 × 10 <sup>4</sup>	4.0 × 10 <sup>5</sup>	1.2 × 10 <sup>5</sup>
K + N + U	0	1 × 10 <sup>4</sup>	0	4.4 × 10 <sup>5</sup>	0
K + N + Fc	0	1 × 10 <sup>4</sup>	3 × 10 <sup>4</sup>	5.6 × 10 <sup>5</sup>	2 × 10 <sup>4</sup>
K + G + U	1.0 × 10 <sup>5</sup>	7.1 × 10 <sup>5</sup>	2.1 × 10 <sup>5</sup>	5.5 × 10 <sup>6</sup>	0
K + U + D	0	7.1 × 10 <sup>5</sup>	3.4 × 10 <sup>5</sup>	4.72 × 10 <sup>6</sup>	1.2 × 10 <sup>5</sup>
K + G + D	1.7 × 10 <sup>5</sup>	1.42 × 10 <sup>6</sup>	1.44 × 10 <sup>6</sup>	1.662 × 10 <sup>7</sup>	4 × 10 <sup>4</sup>

\* Fungase , Funcelase , Novozyme Glucanex , Driselase , Uskizyme and Kitalase are abbreviated as Fg , Fc , N , G , D , U and K respectively.  
\*\* Each value represents the average of two experiments. The concentration of enzyme was 20mg/mL.  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

2.2 培养基对原生质体分离效率的影响

培养基影响原生质体的分离效率(表 2)。一方面,对于同一菌株,不同的酶组合对应的适宜培养基不同,如菌株 CBⅢ 酶组合 K+D 对应的适宜培养基是 V<sub>8</sub>,K+D 处理经 CM 和 V<sub>8</sub> 培养的 CBⅢ 菌丝,原生质体分离效果相差近 10 倍;而 K+G 对应的适宜培养基是 CM。另一方面,不同菌株的适宜

培养基也不同,菌株 CBⅠ-2 经 V<sub>8</sub> 培养,其原生质体的浓度较经 CM 培养时提高 10~100 倍左右。另外某些供试菌株如 MY、DQ 和 GG,虽然经不同的培养基、酶组合处理,原生质体的分离效率仍然较低,浓度未能达到 10<sup>6</sup>/mL 以上(数据未显示)。

表 2 培养基对 *E. turcicum* 原生质体分离效率的影响

Table 2 Effect of medium on the isolation frequency of protoplast in *E. turcicum*

Enzyme Combination	CBⅢ				CBⅠ-2			
	CM	V <sub>8</sub>	V <sub>8</sub> TY	PD	CM	V <sub>8</sub>	V <sub>8</sub> TY	PD
K+D*	182**	1168	533	100	8	566	20	5
K+G	1718	712	466	179	24	358	12	16
K+U	700	451	216	126	36	316	28	1
K+G+D	1900	1440	375	416	52	895	144	28

( × 10<sup>4</sup> )

\* Abbreviation is the same as that of table 1. \*\* Each value represents the average of three experiments. The concentration of enzyme was 20mg/mL.

2.3 酶组合浓度及降解时间对原生质体分离效率的影响

当酶组合的浓度为 20mg/mL 时,其分离的原生质体浓度较酶浓度 10mg/mL 时提高 70% 以上,而酶组合浓度为 40mg/mL 时,原生质体的分离效率并未随之显著提高。因此比较适宜的酶浓度为 20mg/mL。酶对菌丝的处理时间以 40min~1h 为宜。降解反应时间超过 1h,原生质体的分离效率并无相应的提高。

2.4 原生质体的转化

采用环状质粒 DNA 和 Restriction enzyme-mediated intergration (REMI) 方法,初步测试了质粒 pAN71, pCB1004 和 pHPT311 对 *E. turcicum* 的转化效率。试验结果表明 pCB1004 和 pHPT311 不适用于 *E. turcicum* 的转化。供试的 3 种质粒中只有 pAN71 的 hygromycin B phosphate dehydrogenase 基因能够在 *E. turcicum* 中表达,转化后原生质体可以形成 Hyg<sup>R</sup> 抗性菌落。加入限制性内切酶 *Hind*Ⅲ 未提高转化的效率,环状质粒 DNA 的转化效率高于 REMI(表 3)。转化体经引物 HPT630 和 HPT1030 扩增后产生 0.4kb 的特异扩增带,受体 CBⅢ 没有相应的扩增带产生,初步表明质粒插入到转化体的基因组中(图 1)。

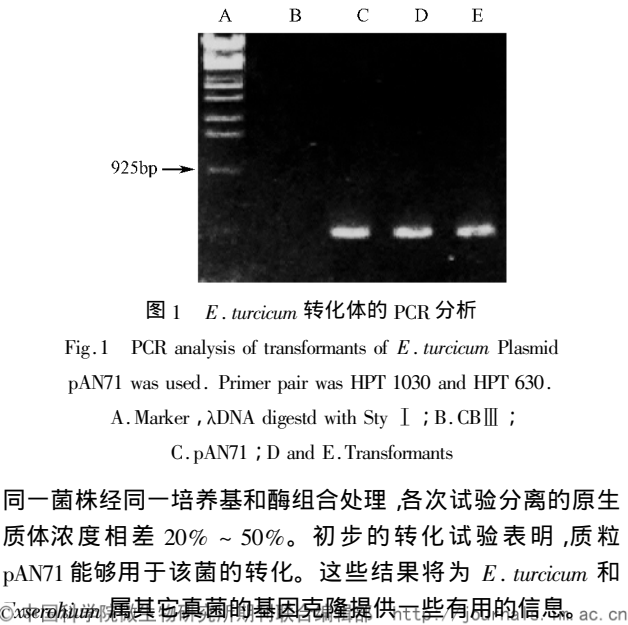
综上所述,细胞壁降解酶和菌株生长特性是决定 *E. turcicum* 原生质体分离效率的两个关键因素。常用的细胞壁降解酶如 Fungase, Funcelase, Novozyme, Glucanex, Driselase 以及 Uskizyme 对 *E. turcicum* 细胞壁均无降解作用。一些酶对 *E. turcicum* 细胞壁具有协同降解作用,如酶组合 Glucanex + Kitalase, Glucanex + Kitalase + Driselase,可以使分离的原生质体浓度达到 1 × 10<sup>7</sup> /mL 以上,完全能够用于转化。针对不同的菌株,选用相应的培养基及酶组合是比较经济有效的方法。菌丝的生长状态也对原生质体的分离效果有很大影响,

表 3 不同质粒转化 *E. turcicum* 的效率

Table 3 Effect of REMI and circular plasmid on the transformation frequency in *E. turcicum*

Plasmid	REMI (Linearized plasmid + <i>Hind</i> Ⅲ) ( u/mL )			Circular plasmid
	20u*	50u	100u	
PAN71	14**	0	0	158
PCB1004	0	0	0	0
PHPT311	0	0	0	0

\* Amount of enzyme. \*\* No. of transformation/10<sup>7</sup> protoplast. Each value represents the average of three experiments. The strain used in experiment was CBⅢ.



## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Anonymous. A compendium of corn diseases. Am Phytopathol Soc , St. Paul , MN. 1973 , pp.66
- [ 2 ] Raymundo A D , Hooker A L. Measuring the relationship between northern corn leaf blight and yield losses. *Plant Disease* , 1981 , **65** : 325 – 327
- [ 3 ] Perkins J M , Pedersen W L. Disease development and yield losses associated with northern leaf blight on corn. *Physiological Plant Pathology* , 1987 , **4** : 161 – 165
- [ 4 ] Smith D R , Kinsey J G. Further physiologic specialization in *Helminthosporium turcicum*. *Plant Disease* , 1980 , **64** ( 8 ) : 779 – 781
- [ 5 ] Abadi R , Levy Y , Bar – tsur A. Physiological races of *Exserohilum turcicum* in Israel. *Phytoparasitica* , 1989 , **17** ( 1 ) : 23 – 30
- [ 6 ] ZHANG L H ( 张利辉 ) , XING J H ( 邢继红 ) , DONG J C ( 董金皋 ). Bioassay and fraction analysis of HT-toxin produced by *Exserohilum turcicum* race 2. Hebei Nongye Daxue Xuebao ( 河北农业大学学报 ) , 2001 , **24** : 42 – 45
- [ 7 ] Abadi R , Perl – Treves R , Levy Y. Molecular variability among *Exserohilum turcicum* isolates using RAPD ( random amplified polymorphic DNA ). *Canadian Journal of Plant Pathology* , 1996 , **18** : 29 – 34
- [ 8 ] Bashan B , Levy R S , Cojocaru M , Levy Y. Purification and structural determination of a phytotoxic substance from *Exserohilum turcicum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* , 1995 , **47** : 225 – 235
- [ 9 ] Bashan B , Abadi R , Levy Y. Involvement of a phytotoxic peptide in the development of the Northern leaf blight of corn. *European Journal of Plant pathology* , 1996 , **102** : 891 – 893
- [ 10 ] Finkelstein D B. Transformation Biotechnology of filamentous fungi , technology and products. Finkelstein D B , Ball C ( eds ). Butterworth-Heinemann , Stoneham , MA. 1992 , pp. 113 – 156
- [ 11 ] Shi Z , Christian D , Leung H. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme mediated intergration of plasmid DNA. *Phytopathology* , 1995 , **85** : 329 – 333
- [ 12 ] Boller M , Boller H U , Braun K H , Giesl J , Kahmann R. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration ( REMI ). *Mol Gen Genet* , 1995 , **248** : 547 – 552
- [ 13 ] James A S , Anne M C , Leonard F , Forrest G C , Barbara V. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *MPMI* , 1998 , **11** ( 5 ) : 404 – 412
- [ 14 ] Punt P J , Oliver R P , Dingemans M A , Pouwels P H van den Hondel C A M J J. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance maker from *Escherichia coli*. *Gene* , 1987 , **56** : 117 – 124
- [ 15 ] Vollmer J , Yanofsky C. Efficient cloning of gene of *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci* , 1986 , **83** : 4869 – 4873
- [ 16 ] Nakata M , Tanaka C , Tsunewaki K , Tsuda M. RFLP analysis for species separation in genera *Bipolaris* and *Curvularia*. *Mycoscience* , 1994 , **35** : 271 – 278

Protoplast Isolation and Transformation of *Exserohilum turcicum*ZHOU Yong-Li<sup>1\*</sup> TANAKA Chihiro<sup>2</sup> MATSUSHIMA Satoshi<sup>2</sup> TSUDA Mitsuya<sup>2</sup><sup>1</sup>( Key Laboratory of Crop Genetic and breeding of Ministry of Agriculture , Institute of Crop Breeding and Cultivation , CAAS , Beijing , China )<sup>2</sup>( Faculty of Agriculture , Kyoto University , Kyoto 606-8502 , Japan )

**Abstract** Northern corn leaf blight , caused by the fungus *Exserohilum turcicum* Pass. ( Leonard and Suggs ) , is one of the major diseases in most corn-growing areas of the world. Research on gene tagging of *E. turcicum* has been limited due to the lack of an efficient transformation system. Since *E. turcicum* produces and accumulates melamin in cell walls during vegetative growth , it is difficult to efficiently isolate its protoplast. To isolate the protoplast of this pathogen with a high frequency , the effects of cell wall degradation enzymes , including  $\beta$ -1,3-glucanase ( Fungase , Fungelase , Novozyme and Glucanex ) and  $\beta$ -glucuronidase ( Driselase , Uskizyme and Kitalase ) , enzyme concentrations , combinations , strains and medium on the isolation frequency were tested. The isolation frequencies were high enough for transformation when the combinations of ( Kitalase + Glucanex + Driselase ) , ( Kitalase + Glucanex ) or ( Kitalase + Uskizyme ) were used. Moreover , the isolation frequencies of protoplast were significantly affected by the cultural morphologies of strain and the growth stage of mycelia. Among the plasmids tested , only plasmid pAN71 is efficient for transformation of *E. turcicum*. This result will provide some useful information for gene tagging of *E. turcicum* and other species in *Exserohilum*.

**Key words** *Exserohilum turcicum* protoplast isolation transformation