

稻瘟病菌致病突变体的 REMI 诱变与鉴定

刘树俊* 魏荣宣

(中国科学院遗传所植物细胞与染色体工程国家重点实验室 北京 100101)

有江 力 山口 勇

(日本理化学研究所微生物制御研究室)

摘要 以水稻“爱知旭”(Aichi-ashahi)为寄主,将带选择标记的质粒 pCSN43 和 pBF101 为外源 DNA,利用限制酶诱导整合(REMI)这种新方法转化稻瘟病菌原生质体,从筛选到的数百个转化体中分离出 3 个与致病能力密切相关的突变体 R2H65、R2H69 和 R2B1565。其中, R2H65 和 R2H69 只产生畸形分生孢子,分生孢子的发育和附着胞的形成以及黑色素的合成均受到极大影响,致病性测试证明完全丧失致病能力;R2B1565 的许多表型与野生型的相似,但致病能力却大大降低。

关键词 致病性,稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*),限制酶诱导整合(REMI),杀稻瘟菌素(BS),潮霉素 B(HYGB)

学科分类号 Q933

稻瘟病是一种真菌病害,由稻瘟病菌感染所致,在全世界所有水稻生长区流行,每年均导致重大经济损失。稻瘟病菌的致病机理非常复杂。首先,菌体本身复杂多变,在田间不断有新的致病类型(生理小种)出现。频繁产生的生理小种严重妨碍水稻稻瘟病抗性品种的选育。其次,病菌的致病涉及许多生理生化过程:当无性孢子(分生孢子)降落到水稻叶面上,感染周期就开始了(在自然界,稻瘟病菌几乎都是通过无性孢子的繁殖进行传播的^[1])。分生孢子通过水合作用和其尖端外围胞质释放粘稠物质,紧紧吸附在叶面上^[2], 2h 之内,孢子发芽,产生一短萌发管,管尖端形成具有感染能力的并沉积有大量黑色素的细胞结构——附着胞^[3]。附着胞紧紧贴着叶片,借助接触面产生的内部膨胀压力和形成的穿透胚栓(Peg)穿破角质,进入叶肉组织。感染菌丝体在叶肉组织中进行分枝、分化形成球状结构,尔后又分叉产生第二级菌丝体。这种菌丝体可在胞内和胞间传播,感染后 100h 左右,由于迅速退绿和组织坏死,最终在寄主叶片上出现椭圆形病斑^[4]。严重时,病斑覆盖大部分叶面,从而导致寄主死亡。由于许多突变体在不同程度上影响真菌的致病能力,因此,有关基因在致病中扮演关键角色。一旦致病基因失活,真菌的致病能力就下降或完全丧失。迄今,已有一些致病基因被克隆,比如 SMO^[5], CUT1^[6], MPG1^[7], PWL2^[8], NUT1^[9]等。我们用 REMI 随机诱变稻瘟病菌,以期产生致病性突变体,从已知的表型变化,探讨相关基因或调控序列,从而为阐明稻瘟病菌致病的遗传机理奠定基础。

* 现通讯地址:中国科学院人事局。

收稿日期:1997-06-23,修回日期:1998-02-21。

1 材料和方法

1.1 材料

稻瘟病菌:野生型 70-6(Mat1-2)和 70-15(Mat1-1),储存在 -150°C 或将干燥菌丝体置于 -20°C 。

质粒: pBF101^[10],杀稻瘟菌素抗性质粒; pCSN43^[10],潮霉素 B(HygromycinB,简称 HYGB,下同)抗性质粒; pBF101 和 pCSN43 分别用 Kpn I 或 Xho I 切割线状化。

培养基和药品:同文献[11]所述,但 STC[1.2mol/L 山梨糖(Sorbitol),25mmol/L Tris-HCl, pH7.5,40mmol/L CaCl_2]和再生培养基(YG1/2SC)中的 CaCl_2 均为 40mmol/L。

水稻品种:爱知旭(AiChi-ashahi)。

1.2 方法

1.2.1 转化与筛选:用纤维素酶(Onozuka R-10)和 Driselase(Kyowa)降解生长旺盛的稻瘟病菌菌丝体,制备原生质体。将 0.2ml 质粒溶液(线状化 pBF101 和 pCSN43 各 2.5 μg 加 200u Kpn I 或 XhoI)与 0.8ml STC(含 $0.5 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^8$ 原生质体)混合,在 50ml 试管中冰浴 20min 后,滴加 3ml PEG 溶液(PEG4000,60%,40mmol/L CaCl_2 ,25mol/L Tris-HCl, pH7.5),冰浴 20min,室温放置 15min。用 STC 冲洗后悬浮于再生培养基中,室温过夜。用含 HYGB 或 BS 的再生培养基筛选, HYGB 和 BS 的终浓度呈梯度变化(200 \rightarrow 400 \rightarrow 600 \rightarrow ... \rightarrow 2400 $\mu\text{g}/\text{ml}$),将形成的群集转入含 HYGB 或 BS 的 PDA(Potato Dextrose Agar)中再选。

1.2.2 分生孢子形成:将菌落边缘的菌丝体转入燕麦片(Oatmeal)培养基(1000ml 中含燕麦片 50g,蔗糖 20g,琼脂 15g), 28°C 培养 7~10d 后,用蓝色荧光灯(BLB)照射,室温培养 4~5d,分生孢子成熟。

1.2.3 附着胞形成:将分生孢子水溶液滴在聚碳酸酯(Polycarbonate)表面,在室温、避光、100%相对湿度下培养 10~15h,产生附着胞。正常的附着胞能紧紧吸附在聚碳酸酯的表面。

1.2.4 电镜装片制作:A 固定:将标本浸入固定液 I (5%戊二醛,0.2%鞣酸), 4°C 放置 10~16h 后,浸入固定液 II (5%戊二醛,2%鞣酸), 4°C 放置 10~16h 用水冲洗 2~3 次,每次 30min,加固定液 III (1% OsO_4), 4°C 放置 20h; B 脱水:用从低到高的浓度梯度酒精脱水,依次为 30% (5min) \rightarrow 50% (5min) \rightarrow 70% (5min) \rightarrow 90% (20min) \rightarrow 99% (20min) \rightarrow 100% (20min) (重复 3 次); C 冰冻干燥:用 HITACHI ES-2020 冻干机; D 包埋:用 HITACHI E-102 ION Spatter; E 观察:用 HITACHI S-2350 扫描电子显微镜。

1.2.5 致病性检测:用打孔钳在五叶期水稻叶上表面,沿主叶脉两旁打孔(切莫将叶片打穿)。将约 50 μl 分生孢子溶液($10^5 \sim 10^6/\text{ml}$)滴在孔上,保持至少 80% 的相对湿度,在 25°C 培养 5~7d。用喷洒方式感染三叶期(约 15d)水稻。检测实验重复 4 次。

2 结果

2.1 转化子

经转化处理的原生质体,置于含 BS 或 HYGB 的再生培养基中筛选,BS 浓度为 300~

2400 $\mu\text{g/ml}$, HYGB 浓度为 200~2000 $\mu\text{g/ml}$, 呈梯度变化。虽然 BS 和 HYGB 在液体培养基中的作用效果比在固体培养基中差, 但如此高的浓度足以抑制非转化原生质体形成群集。当真正的转化原生质体形成群集后, 转入 PDA 中再选。PDA 中含 250 $\mu\text{g/ml}$ BS 或 300 $\mu\text{g/ml}$ HYGB, 一共获得 400 多个转化体。

2.2 表型特征

从 400 多个转化体中, 筛选出 3 个突变体, 其表型特征见表 1。突变体 R2H65、R2H69、R2B1565, 是从 REMI 诱变剂转化子中分离出来的, 其中 R2H65、R2H69 的分生孢子形态异常(如图版 I-2, 3)。野生型的分生孢子呈倒梨形(图版 I-1)。R2B1565 的许多特征与野生型基本相同。

表 1 REMI 突变体的特征
Table 1 Traits of REMI mutants

	R2H65	R2H69	R2B1565
Source	Matl-2, REMI mutant of 70-6, anti-HYGB	Matl-2, REMI mutant of 70-6, anti-HYGB	Matl-1, REMI mutant of 70-15, anti-BS
Conidium morphology	Mixture of abnormal, such as narrower and longer rode(40~50 $\mu\text{mol/L}$), single-or two-cell, wide-type-like conidia etc.	Abnormal conidia (45~50 $\mu\text{mol/L}$), narrower and longer (than those of wild type)	Same as those of wild type (20~25 $\mu\text{mol/L}$)
Ability of producing conidium	Less than wild type (about 78.4% as many as that of wild type)	Less than wild type (about 71.8% as many as that of wild type)	Similar to wild type
* Rate of conidium germination	85% as much as that of wild type	62% as much as that of wild type	Analogous to that of wild type
# Appressorium formation	About 7.8% of germinating conidia producing abnormal appressorium	No appressorium formed.	Similar to wild type
Capability of yielding hyphae	Analogous to wild type	Analogous to wild type	Analogous to wild type
Speed of growth	Almost same as that of wild type (in PDA)	Almost same as that of wild type (in PDA)	Almost same as that of wild type (in PDA)
Pathogenicity	Causing no disease	Causing no disease	Much reduced

* Germination percentage was average of five microscope views (about 65~70 conidia examined per view) 20h after spreading conidia onto the surface of polycarbonate.

Percentage appressorium formation was average of appressoria formed per germlings observed in four slide preparation, approximately 90~100 germlings scored per slide

在聚碳酸酯上, 野生型的分生孢子 5~12h 内萌发出较短萌发管后形成附着胞, 而突变体的分生孢子, 有的从一端、有的从两端萌发形成萌发管。绝大多数 R2H65 分生孢子以及所有 R2H69 分生孢子不能形成附着胞, 它们的萌发管最终形成网状的菌丝体。不过, R2H65 萌发的分生孢子中有 7.8% 能形成极不正常的附着胞, 只是萌发管伸得比较长(图版 I-4~10)。而 R2B1565 则与野生型相似。

2.3 致病性分析

附着胞能借助机械或酶的作用, 穿透叶片角质层和表皮细胞, 因此在稻瘟病致病中扮

演极重要角色。而 R2H65 和 R2H69 不能形成附着胞,因此需人为将叶片致伤。当用打孔钳将爱知旭叶表面创伤,滴上分生孢子溶液,野生型 4~5d 就出现症状。然而,突变体 R2H65、R2H69, 8~10d 后仍无病症出现,同阴性对照(水)的表象相似,完全失去致病能力(图版 I-11)。而 R2B1565 在 8~10d 才出现比较小的病斑,致病能力明显下降(未出示图片)。当喷洒分生孢子溶液到三叶期的幼苗,感染 8~10d,病理特征同创伤感染一样。

3 讨 论

稻瘟病菌是单倍、异宗配合的丝状子囊真菌。由于人们已创造出能进行有性繁殖的实验室品种,可人为控制其有性世代^[4],而且建立了比较完善的转化系统^[11,12],因此,稻瘟病菌作为研究寄主与病原体相互作用机理的模型,引起病理学界和遗传学界的浓厚兴趣。80 年代末至 90 年代初,遗传病理研究主要集中在寄主与病原体的相互识别和早期感染过程^[4]。对于如何将致病的全过程从发展动态的角度,通过病理分子遗传机制(包括相关基因的克隆)加以研究,没能给予应有的重视。Hamer 等^[5]第一次鉴定出几个分生孢子突变体(SMO),它们只产生形态不正常的分生孢子和附着胞,突变体的致病能力也降低了^[13]。然而,分生孢子的生产能力和孢子梗的发展未受影响。Shi^[1]用电激、化学和插入诱变获得几个突变体,其中 Con1-B、Con-2~4、Con7 产生形态不正常的分生孢子,Con5、6 不产生分生孢子。这些畸形分生孢子的萌发、附着胞形成、黑色素合成及致病能力,皆受不同程度的影响。我们用 REMI 获得了 3 个突变体:R2H65、R2H69 和 R2B1565。转种若干代后,从未发现回复突变,说明它们是非常稳定的突变体。其中,R2H65、R2H69 是分生孢子突变体:R2H65 能产生数种形态的分生孢子,包括狭长的棒形、类似野生型的、尖端变细的、单个或两个细胞的、椭圆的分生孢子等;R2H69 只产生细长的分生孢子。畸形分生孢子的萌发率、附着胞形成、黑色素合成能力下降,突变体完全丧失致病性。也许形态遗传同致病之间有某种功能关系。突变体 R2B1565 分生孢子形态、萌发、生产能力、附着胞形成和气生菌丝生产等方面均同野生型相似,只是致病能力大为降低,包括致病速度延长至 8~10d、病斑较小、病斑处产生的分生孢子数目(决定病斑扩展的程度)较少等。

稻瘟病菌的致病性是受多基因控制的。如果某一环节被阻断,其致病性会改变。分生孢子萌发、附着胞形成等属感染的早期过程,即使早期过程正常,如调节致病性中后期的基因失活,稻瘟病菌也无法正常感染其宿主。R2B1565 的早期生长过程与野生型相同,我们用喷洒和人为制伤叶面两种方式感染水稻,所产生的病理特征一样,说明此突变体致病的后期基因被失活。同时,人为创伤水稻叶面,将 R2H65 和 R2H69 的分生孢子溶液滴在创伤处进行测定,8~10d 后仍无病斑出现,结果同喷洒方式的一样。这说明此两突变体所失去的致病能力除与分生孢子不能正常萌发、不能形成附着胞等因素相关外,还与穿破叶面后的生长过程有关。

因为,R2H69 只能产生细长的分生孢子、几乎不能形成附着胞、完全丧失致病性,与之相关的 DNA 序列假设为 NPS9(Nonpathogenicity sequence);R2H65 可产生多种形态的分生孢子,7.8% 能形成不正常的附着胞,完全丧失致病能力,该序列假设为 NPS5;

R2B1565 致病能力被降低, 相关序列假设 RPS65(Reduced-pathogenicity Sequence)。根据 3 个突变体的表型变化, 我们可否进行如下推测: 3 个相关序列的功能关系也许为: NPS9 > NPS5 > RPS65。从功能上看, NPS9 也许更接近于调节基因, 它的表达产物可激活或失活一些基因。至于最终结果如何, 只有待相关序列被克隆后才能定论。

致 谢 作者在日本理化学研究所微生物制御研究室工作期间, 曾得到该研究室其他成员的大力帮助, 在此向他们表示最衷心的感谢。

参 考 文 献

- 1 Shi Z X. MPMI, 1994, 7(1):113~120
- 2 Hamer J E *et al.* Science, 1988, 239:188~190
- 3 Howard R J *et al.* Proc Natl Acad Sci. USA, 1991, 88:11281~11284
- 4 Valent B *et al.* Genetics, 1991, 127:87~101
- 5 Hamer J E *et al.* Genetics, 1989, 122:351~361
- 6 Sweigard J H *et al.* MGG, 1992, 232:174~182
- 7 Talbot N J *et al.* Plant Cell, 1993, 5:1575~1590.
- 8 Sweigard J H *et al.* Plant Cell, 1995, 7:1221~1233
- 9 Froeliger N H *et al.* MGG 1996, 251:647~656
- 10 Kimura M *et al.* MGG, 1994, 242:121~129
- 11 Kimura M *et al.* Biosci Biotech Bioche, 1995, 59(6):1177~1180
- 12 Shi Z *et al.* Techniques, 1995, 85(3):329~333
- 13 Hamer J E, Givan S. Mol Gen Genet, 1990, 223:487~495

REMI Mutagenesis and Identification of Pathogenic Mutants in *Magnaporthe grisea*

Liu Shujun Wei Rongxuan

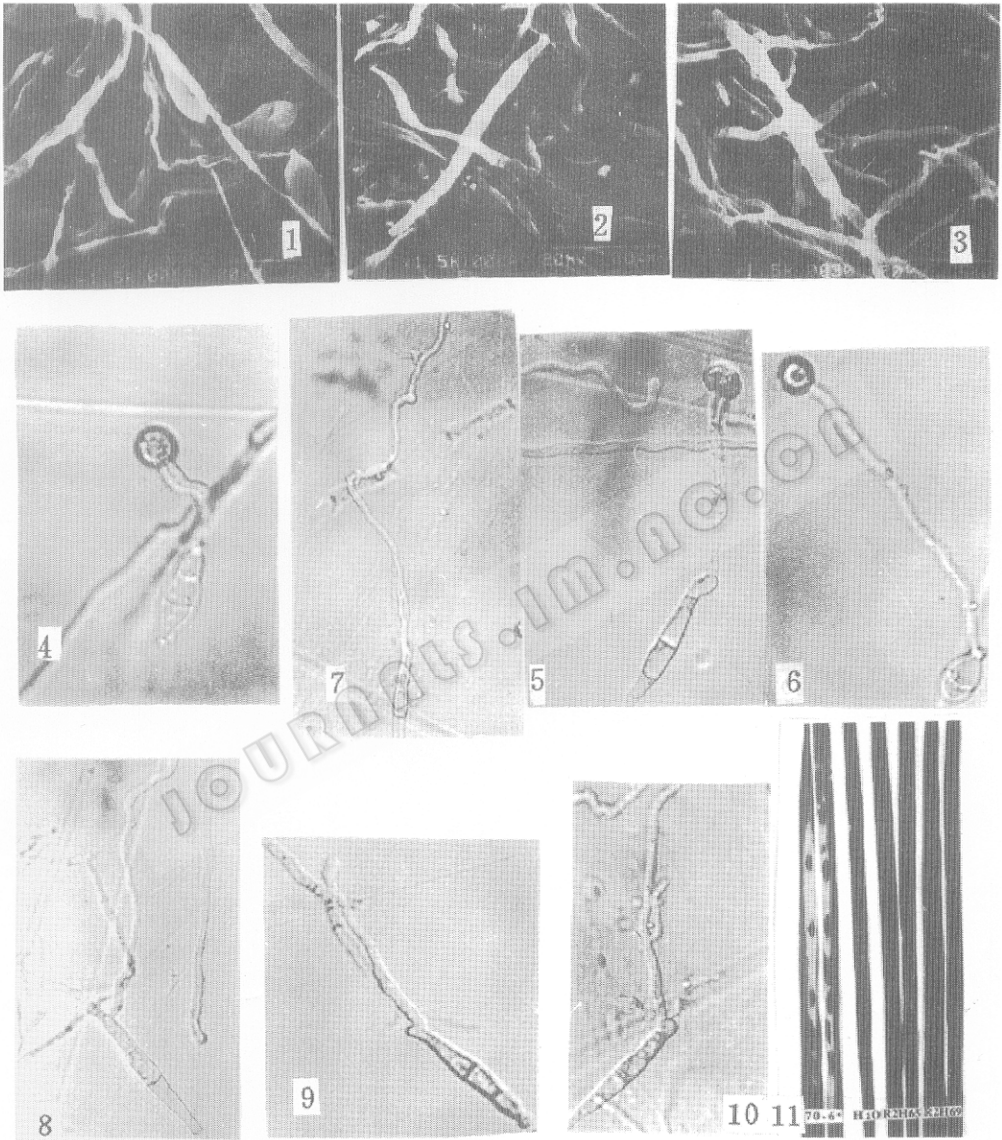
(State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering Institute of Genetics,
The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Tsutomu Arie Isamu Yamaguchi

(Microbial Toxicology Lab. Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)2-1 Hirosawa,
Wako, Saitama 351-01, Japan)

Abstract Rice - Aichi-ashahi was used as host and plasmid pBF101 or pCSN43 as foreign DNA fragment, REMI mutagenesis was applied to tag pathogenic sequence in rice blast fungus *M. grisea*, three mutants-R2H65, R2H69 and R2B1565, related to pathogenicity, were recovered from several hundreds of transformants. R2H69 and R2H65 produced merely strange conidia which could not form appressorium or yield abnormal one, pathogenicity test further confirmed that they were unable to cause disease. R2B1565 owned the same phenotypes as those of wild type except that the ability of causing disease was much reduced.

Key words Pathogenicity, blast fungus (*M. grisea*), hygromycin B (HYGB), restriction enzyme mediated integration (REMI), blasticidin S (BS)



1. Conidia of wild-type under SEM; 2~3. Conidia of mutants under SEM; 4. Normal appressorium of wild-type; 5~6. Abnormal appressorium of mutants; 7~10. Abnormal conidia which can not produce appressorium; 11. Test of pathogenicity: mutants of R2H65, R2H69 were unable to cause disease.