

禾谷镰孢转化体系的优化

袁婷露^{1,2}, 张彦², 於新建², 曹秀云¹, 张栋^{2,*}

¹沈阳农业大学农学院, 沈阳110161; ²中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海200032

摘要: 禾谷镰孢是小麦赤霉病和玉米茎腐病的主要病原真菌。试验优化了聚乙二醇介导的原生质体转化法, 建立了禾谷镰孢高效转化的稳定体系, 并总结了影响转化成功的主要因素。以此方法对禾谷镰孢进行活体荧光标记, 并用转化菌株侵染小麦胚芽鞘, 在荧光显微镜下追踪病原真菌在宿主植物体内的生长及扩展过程。

关键词: 禾谷镰孢; 原生质体; 转化

Optimization of Transformation System of *Fusarium graminearum*

YUAN Ting-Lu^{1,2}, ZHANG Yan², YU Xin-Jian², CAO Xiu-Yun¹, ZHANG Dong^{2,*}

¹College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; ²Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: *Fusarium graminearum* is one of the main pathogens of wheat head blight and maize stalk rot. In this paper, we optimized the transformation method using protoplasts mediated by polyethylene glycol (PEG), therefore set up an efficient transformation system for *F. graminearum*. We also discussed the key factors that affect the transformation efficiency. Using this method, we were able to transform *F. graminearum* with fluorescence marker containing plasmids. Inoculating wheat coleoptiles with fluorescence-labeled *F. graminearum* strain allows live tracking of the growth and spread of *F. graminearum* within host plants.

Key words: *Fusarium graminearum*; protoplast; transformation

过去10年间,数十种真菌的全基因组序列被测定公开,其中包括许多重要的病原真菌,这预示着真菌遗传学的一个大发展(Galagan等2005)。大规模的致病基因筛选、深入的致病机理研究正吸引着全世界越来越多的研究组进行真菌的遗传学操作。虽然真菌的遗传转化相对植物而言更为简便,早在上世纪90年代早期就已建立了许多真菌的转化方法,但是由于真菌的多样性、转化体系的不稳定性等原因,使新加入的研究人员不易掌握。本文详细介绍了稳定可靠的禾谷镰孢的原生质体转化体系,并总结了转化成功的要点。

禾谷镰孢[*Fusarium graminearum* Schwabe, 有性态为 *Gibberella zeae* (Schw.) Petch, 称玉蜀黍赤霉]是小麦和大麦赤霉病的主要致病真菌。赤霉病在世界范围内尤其是亚洲、美洲、欧洲的强烈爆发,对世界粮食资源形成了严重威胁(Dubin等1997)。在美国,赤霉病在植物病害中影响最大,仅在90年代,就使美国农业经济损失了3亿美元(McMullen等1997; Windels 2000)。在我国,小麦赤霉病也蔓延广泛,造成的损失仅次于小麦条锈病(赵凌和魏莉娟2003)。同时,禾谷镰孢还

能侵染玉米和水稻等禾谷类作物使其染病(Webster和Gunnell 1992; White 1999)。禾谷镰孢带来的危害是双重的:其一,它感染谷类,降低种子的品质和产量;其二,它产生脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)等真菌毒素,使感病的谷物不能再被作为食物或饲料(McMullen等1997)。

目前,禾谷镰孢菌株PH-1(NRRL31084)的全基因组序列已被测出,该菌株在欧洲和北美被发现,并在世界范围都有分布(O'Donnell等2000)。该菌株全基因组序列的测出,对于研究禾谷镰孢的致病基因及其致病机理有着重要意义。因此,一个高效稳定的转化方法是从遗传学角度研究禾谷镰孢致病基因必不可少的。本实验室在已有试验方法的基础上建立了稳定的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的原生质体转化法,对禾谷镰孢PH-1菌株进行活体荧光标记,并用此禾谷镰孢侵

收稿 2008-01-28 修定 2008-03-17

资助 国家“973”计划(2006CB101901)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-N-005)。

* 通讯作者(E-mail: dzhang@sippe.ac.cn; Tel: 021-54924074)。

染小麦胚芽鞘, 在荧光显微镜下观察真菌对小麦的侵染过程。

材料与方 法

1 供试菌株、小麦品种及质粒

禾谷镰孢 PH-1 菌株(*Fusarium graminearum*) (图 1), 由美国的普渡大学徐金荣教授提供。NRRL5883 菌株购自中国普通微生物菌种保藏中心(编号 3.4521); 小麦(*Triticum aestivum*)品种为感病品种‘中原 98-68’; 质粒 pZD101 (图 2), 是将质粒 pUC18(TaKaRa D3218)加入了潮霉素(hygromycin B)抗性片段、荧光(AmCyan)片段(来自 BD Clontech 公司)和粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*) VM3 启动子片段而获得; pZD101-RFP 与 pZD101 结构基本相似, 只是将 AmCyan 荧光片段改为 RFP 红色荧光片段。

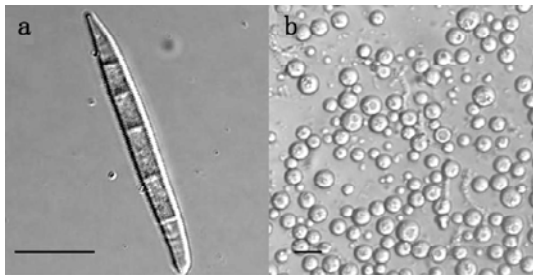


图 1 禾谷镰孢 PH-1 分生孢子和原生质体

Fig.1 *Fusarium graminearum* PH-1 spore and protoplast
a 为分生孢子, b 为原生质体, 标尺为 20 µm。

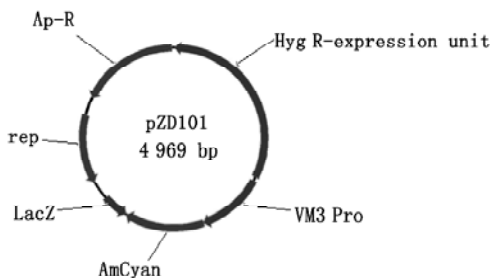


图 2 质粒 pZD101

Fig.2 Vector pZD101

2 培养基和试剂

V8 培养基(Tuite 1969): 163 mL V8 果汁, 1.0 g 碳酸钙, 15 g 琼脂, 定容到 1 L 水; 绿豆培养基[根据姚红燕等(2005)方法稍作改动]: 1 L 水加 40 g 绿豆, 放入高压灭菌锅(注: 一般用煤

气煮沸, 但由于火候原因造成批次之间差异较大, 改用高压灭菌锅比较稳定), 121 °C 10 min, 单层纱布过滤除渣; TB₃ 培养基(Hou 等 2002): 1.0 g 酵母膏, 3.0 g 水解酪蛋白, 20% 蔗糖, 0.7% 琼脂糖; 低熔点 TB₃ 培养基(Hou 等 2002): 1.0 g 酵母膏, 3.0 g 水解酪蛋白, 20% 蔗糖, 0.7% 低熔点琼脂糖; YEPD 培养基(Hou 等 2002): 3.0 g 酵母膏, 10.0 g 蛋白胨, 20.0 g 葡萄糖, 定容于 1 L 水; STC 缓冲液(Hohn 和 Desjardins 1992): 20% 蔗糖, 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 50 mmol·L⁻¹ 氯化钙, pH 8.0; PTC 缓冲液: 40% PEG4000, 溶于 STC。

崩溃酶(driselase): Sigma D9515; 几丁质酶(chitinase): Sigma C6137; 溶解酶(lysing enzyme): Sigma L1412; 液体溶菌酶(cell wall degrading enzyme complex): Sigma V2010; 氨苄青霉素(ampicillin): Sigma A9518; 潮霉素(hygromycin B): Sigma H3274。

菌丝酶解混合液的配制: 750 mg 崩溃酶, 12 mg 几丁质酶, 450 mg 溶解酶, 溶于 30 mL 1.2 mol·L⁻¹ 氯化钾, 在脱色摇床上轻摇(120 r·min⁻¹) 1 h 后, 使其充分溶解, 离心(8 000×g) 8 min, 弃沉淀, 取上清用作菌丝酶解混合液。

扩增潮霉素抗性基因的一对引物为 5'-CATACTCTTCCTTTTCAATTCAATGCGT-3', 5'-CGCGGCTTCGAATCGTGGCTA-3', 扩增条件为 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环。扩增 AmCyan 荧光标记基因的一对引物为 5'-TAGCCCTGTCCAACAAGTTCATC-3', 5'-TTAGAAGGGCACCACGGAGGT-3', 扩增条件为 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环。

3 禾谷镰孢原生质体制备

用无菌水从 V8 培养基上洗下培养 1~2 周的 PH-1 的孢子, 在 100 mL 绿豆培养基中, 在 25 °C 下振荡(150 r·min⁻¹)培养 3 d。单层纱布过滤离心后, 收集孢子沉淀, 重悬于 100 mL YEPD 培养液中, 在 25 °C 下振荡(175 r·min⁻¹)培养 12~14 h (注: 严格控制不超过 14 h)。单层纱布过滤培养液, 收集留在纱布上的菌丝部分, 用菌丝酶解混合液重悬(酶解 100 mL YEPD 培养液中的菌丝, 用 30 mL 酶解混合液), 在 30 °C 下振荡(90 r·min⁻¹)酶

解 1~2 h。期间每隔 0.5 h 在显微镜下观察原生质体形成情况。在原生质体明显大量增多时, 用尼龙膜(Nitex nylon membrane, 孔径 30 μm)过滤菌丝酶解液, 离心(1 000 $\times g$) 5 min, 收集沉淀中的原生质体。用 1.2 mol·L⁻¹ 氯化钾洗原生质体沉淀。离心(1 000 $\times g$) 5 min。期间显微镜观察, 并用血球计数板计数原生质体数目。用 STC 重悬原生质体, 使其终浓度为 $2\times 10^7\sim 5\times 10^7$ 个·mL⁻¹。分装原生质体于 EP 管, 每管 200 μL 。慢冻后保存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 。一般每 100 mL YEPD 菌液可得到 10 mL 原生质体。

4 原生质体转化

将质粒 pZD101 用 *SspI* 单酶切为线性, 试剂盒切胶回收(博大泰克 MK005-2), 取 20 μL (约 3 μg), 加入到 200 μL 上述原生质体中, 混匀, 静置 15 min, 分 3 次依次加入 100、200 和 700 μL PTC, 每次间隔 1 min, 混匀, 再静置 10 min, 然后与 5 mL 含氨苄青霉素(终浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的低熔点 TB₃ 培养基(提前在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温使其保持液体形态)温和混匀, 在加有氨苄青霉素(终浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 可以抑制细菌生长)和潮霉素(终浓度为 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 TB₃ 培养基上铺平板, 室温培养 4~5 d 即有菌斑长出。

5 胚芽鞘侵染法

根据 Wu 等(2005)方法稍作改动, 在小麦真叶未长出时将小麦胚芽鞘剪去 2~3 mm, 用棉花条包裹, 往棉花条中注入 50 μL PH-1 孢子菌液(孢子浓度为 10^7 个·mL⁻¹), 将小麦置于光照培养箱内在 24 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 99% 的条件下培养 3 d 后, 取下棉花, 继续培养并观察病斑形成情况, 并在显微镜下观察菌丝在胚芽鞘细胞中的生长情况。

实验结果

1 原生质体制备及转化方法

经多次试验, 首先在液体的绿豆培养基中培养 72 h 后获得大量孢子, 然后转接到 YEPD 液体培养基中, 继续培养 12~14 h, 这样得到的大量新生菌丝作为原生质体制备的初材效果较好且稳定。

在 PEG 介导的转化方法中, 酶解制备原生质体是关键。我们采用了 Sigma 公司的各种酶(材料与 方法 2), 并针对这些酶所需的酶解条件, 分别

进行了试验。

1.1 缓冲液浓度对原生质体制备的影响 缓冲液对酶的活性以及原生质体的稳定影响很大。我们试验了 KCl 的不同浓度, 发现用 1.2 mol·L⁻¹ KCl 作为缓冲液原生质体得率最高(图 3)。

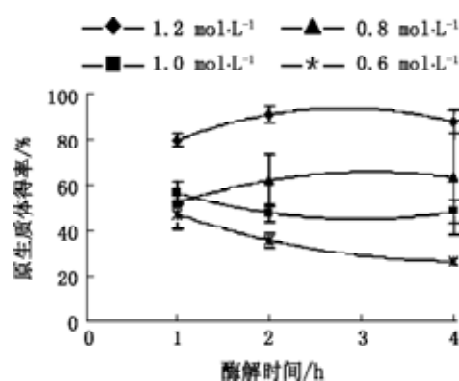


图3 酶解缓冲液 KCl 的浓度与原生质体得率的关系
Fig.3 Effects of enzyme buffers at different KCl concentrations on percentage of protoplasting

1.2 酶解液比例和酶解时间对原生质体制备的影响 配制 1 mL 酶液, 分别尝试 4 种组合: 25 mg 崩溃酶, 0.1 mg 几丁质酶, 5 mg 溶解酶; 25 mg 崩溃酶, 0.1 mg 几丁质酶, 15 mg 溶解酶; 25 mg 崩溃酶, 0.4 mg 几丁质酶, 5 mg 溶解酶; 25 mg 崩溃酶, 0.1 mg 几丁质酶, 5 mg 溶解酶, 100 μL 液体溶菌酶。结果表明, 采用第 1 种和第 2 种组合的酶解液时原生质体得率最高(图 4)。因此将第 1 种和第 2 种组合比例综合, 在 1 mL 酶解液中加入 25 mg 崩溃酶, 0.4

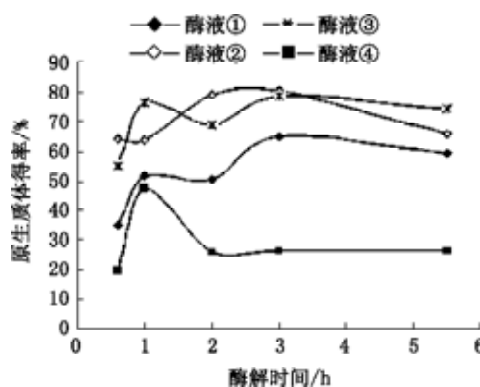


图4 酶解液比例、酶解时间及原生质体得率的关系
Fig.4 Effects of different enzymatic lysis time and enzyme combinations on percentage of protoplasting

mg 几丁质酶, 15 mg 溶解酶。

试验表明, 酶解时间在 1 h 之后原生质体得率大幅提高, 虽然随着时间的延长得率还有所提高, 但是酶解时间过长会影响原生质体的活力, 降低转化效率, 因此将酶解时间控制在 1~2 h。

1.3 转化及转化子的鉴定 我们采用带有组成型表达启动子驱动下的 *AmCyan* 荧光蛋白基因的 *pZD101* 质粒 DNA 转化禾谷镰孢 PH-1 菌株。经 4~5 d 培养后筛选培养基上的菌落为候选禾谷镰孢转化子, 挑取少量菌丝, 在荧光显微镜下观察, 可

以看到菌丝带有明显的蓝绿色荧光(图 5-c、d), 而野生型禾谷镰孢菌丝的自发荧光(图 5-a、b)是很微弱的, 初步可以判断为转化子。提取转化子的基因组 DNA, 以此为模板进行 PCR 扩增, 得到了转入质粒上的抗药性片段和荧光标记片段(图 6), 证实目的 DNA 片段已经插入到禾谷镰孢的基因组中。我们用质粒 *pZD101-RFP* 转化禾谷镰孢 PH-1, 得到红色荧光蛋白标记的禾谷镰孢转化子(图 5-e、f)。用质粒 *pZD101* 转化禾谷镰孢 NRRL5883 菌株, 也得到了 NRRL5883 菌株转化

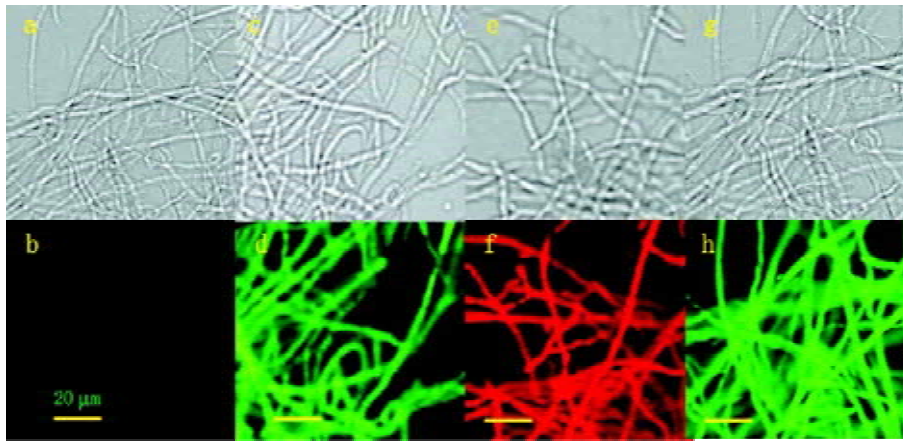


图5 禾谷镰孢菌转化子菌丝

Fig.5 Mycelia of transformants of *Fusarium graminearum*

a、b 为禾谷镰孢野生型菌丝, c、d 为蓝绿色荧光蛋白标记的禾谷镰孢 PH-1 菌丝, e、f 为红色荧光蛋白标记的禾谷镰孢 PH-1 菌丝; g、h 为蓝绿色荧光蛋白标记的禾谷镰孢 NRRL5883 菌丝; b、d、f、h 为荧光显微镜下的照片, 标尺为 20 μm 。

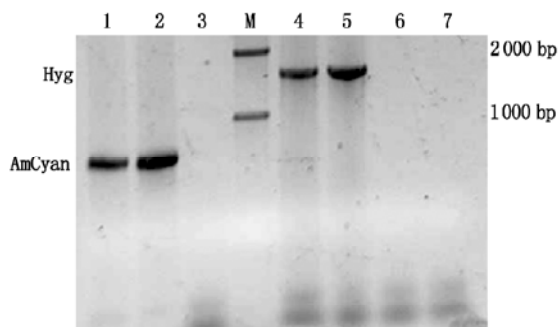


图6 转化子插入片段的 PCR 结果鉴定

Fig.6 DNA fragments amplified by PCR from transformants of *Fusarium graminearum* PH-1

1: 转化子 DNA 为模板扩增荧光基因片段; 2: 质粒 *pZD101* 为模板扩增荧光基因片段; 3: 未转化的对照菌丝 DNA 为模板扩增荧光基因片段; 4: 转化子 DNA 为模板扩增 *Hyg* 基因片段; 5: 质粒 *pZD101* 为模板扩增 *Hyg* 基因片段; 6: 未转化的对照菌丝 DNA 为模板扩增 *Hyg* 基因片段; 7: 未加模板的扩增结果; M: DNA 分子量标记。

子(图 5-g、h)。这就表明该 PEG 介导的原生质体转化体系具有普遍适用性。

一般我们每次用 200 μL 原生质体($2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$)可得到转化子 3~5 个 $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ 质粒 DNA。

2 禾谷镰孢在胚芽鞘细胞中的生长

采用表达荧光蛋白的禾谷镰孢转化子, 我们对禾谷镰孢在宿主体内的侵染过程进行了追踪观察。采用转化菌株接种小麦胚芽鞘部位。10 d 后, 小麦伤口部位产生明显的褐色病斑(图 7)。荧光标记的禾谷镰孢侵染 3 d 后, 将小麦胚芽鞘病斑部位剪下, 在荧光显微镜下观察菌丝在胚芽鞘细胞中的生长情况, 发现菌丝已经侵入胚芽鞘细胞, 并已经扩展到其他细胞(图 8)。

讨论

原生质体转化法因为较简便, 不需要构建像



图7 禾谷镰孢转化菌株侵染小麦胚芽鞘部位 10 d 后胚芽鞘病斑生长情况

Fig.7 Lesions developed on wheat coleoptiles infected by *Fusarium graminearum* transformants 10 days post inoculation

a 为用水处理的对照, c 为禾谷镰孢侵染的胚芽鞘, b 和 d 分别为其胚芽鞘部位的放大图。

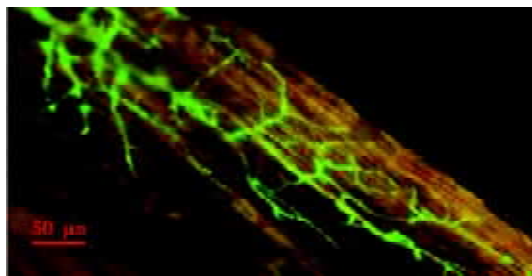


图8 禾谷镰孢菌转化菌株菌丝在胚芽鞘细胞中生长 3 d 的状况

Fig.8 Mycelia within coleoptile cells 3 days post inoculation by *Fusarium graminearum* transformants

在荧光显微镜下观察胚芽鞘病斑部位, 绿色荧光标记的为禾谷镰孢菌丝, 标尺为 50 μm 。

农杆菌转化所需的专门载体, 因而目前仍是最常用的转化方法之一。关于禾谷镰孢的转化方法, 国内外已有报道(Proctor 等 1995; Salch 和 Beremand 1993; 陈利锋 2001), 但是转化效率不稳定且不易重复, 究其原因原生质体质量和得率不高。所以我们主要从以下两方面进行了改进: 一是所收集菌丝的生长状态, 以往报道中往往较为忽视菌丝生长状态的描述, 我们经多次试验, 确定首先在液体的绿豆培养基中培养 72 h 后获得大量孢子, 然后转接到 YEPD 液体培养基

中, 继续培养 12~14 h, 这样得到的大量新生菌丝作为原生质体制备的初材效果较好且稳定; 二是制备原生质体的酶的选用及酶解条件, 以往方法中所用的酶现在市场上有些已不再供应, 使得新开展这一工作的实验室无法重复, 我们采用了 Sigma 公司的各种酶, 并针对这些酶所需的酶解条件, 分别进行了试验, 最终确定酶解液成分为 1 mL 1.2 mol·L⁻¹ 氯化钾中加入 25 mg 崩溃酶, 0.4 mg 几丁质酶, 15 mg 溶解酶, 用此酶解液在 30 酶解新生菌丝得到的原生质体质量较好且得率较高。本文还采用改进的 PEG 介导的转化方法, 对禾谷镰孢 PH-1 菌株进行了 AmCyan、RFP 等荧光标记, 对检验转化成功与否具有直观的效果, 降低了假阳性的几率。经过反复试验证明该方法成熟稳定, 本实验室已用该方法成功转化了数十种不同的质粒, 每 10⁷ 原生质体每微克 DNA 的平均转化效率达到 3~5 个转化子。我们还用同样的方法得到了禾谷镰孢 NRRL5883 菌株转化子, 证明该方法有着普遍适用性。

禾谷镰孢感染小麦, 主要使小麦穗部产生病症。但是在试验中, 从小麦播种到长出穗子, 历时较长, 不适合室内试验。Wu 等(2005)报道, 通过室内禾谷镰孢接种小麦胚芽鞘、观察胚芽鞘产生的病斑大小来鉴定禾谷镰孢致病力的强弱, 其结果与穗部试验结果高度相关。本实验选用感病小麦品种‘中原 98-68’(贾建修和孔凡衫 2005), 采用荧光标记的禾谷镰孢菌株侵染小麦胚芽鞘, 1 d 后即能在显微镜下观察到胚芽鞘细胞中的菌丝, 而且侵染时间越长, 菌丝生长越迅速, 侵染范围越大。

目前, 对禾谷镰孢如何侵染寄主并在寄主体内继续生长等问题, 还没有深入的研究。采用荧光标记的禾谷镰孢菌株侵染小麦, 便于在显微镜下观察禾谷镰孢在寄主细胞中的生长情况, 可能会为解决上述问题提供帮助。

参考文献

- 陈利锋(2001). 禾谷镰孢菌高产毒菌株的构建. 菌物系统, 20 (3): 330~336
 贾建修, 孔凡衫(2005). 小麦新品种中原 98-68. 中国种业, 9: 67~67
 姚红燕, 陈利锋, 孙枫, 陈官菊, 俞刚(2005). 禾谷镰孢 *Tri12* 基因敲除突变体的致病力. 南京农业大学学报, 28 (2): 32~36
 赵凌, 魏莉娟(2003). 小麦赤霉病的危害与检验. 质量跟踪, 12:

- 39~39
- Dubin HJ, Gilchrist L, Reeves J, McNab A (1997). Fusarium Head Blight: Global Status and Prospects. Mexico: International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT)
- Galagan JE, Henn MR, Ma LJ, Cuomo CA (2005). Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. *Genome Res*, 15 (12): 1620~1631
- Hohn TM, Desjardins AE (1992). Isolation and gene disruption of the Tox5 gene encoding trichodiene synthase in *Gibberella pullicaris*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 5: 249~256
- Hou Z, Xue C, Peng Y, Katan T, Kistler C, Xu JR (2002). A mitogen-activated protein Kinase (*MGVI*) in *Fusarium graminearum* is required for female fertility, heterokaryon formation, and plant infection. *Mol Plant-Microbe Interact*, 15 (11): 1119~1127
- McMullen MP, Jones R, Gallenberg D (1997). Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81: 1340~1348
- O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK, Casper HH (2000). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (14): 7905~7910
- Proctor RH, Hohn TM, McCormick SP (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant-Microbe Interact*, 8 (4): 593~601
- Salch YP, Beremand MN (1993). *Gibberella pullicaris* transformants: state of transforming DNA during asexual and sexual growth. *Curr Genet*, 23 (4): 343~350
- Tuite J (1969). *Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria*. Minneapolis: Burgess Publishing Company
- Webster RK, Gunnell PS (1992). *Compendium of Rice Disease*. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society, 62
- White DG (1999). *Compendium of Corn Diseases*. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society
- Windels CE (2000). Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology*, 90: 17~21
- Wu AB, Li HP, Zhao CS, Liao YC (2005). Comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* isolates from China revealed by wheat coleoptile and floret inoculations. *Mycopathologia*, 160 (1): 75~83
- Zheng L, Campbell M, Murray J, Lam S, Xu JR (2000). The *BMPI* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 13: 724~732