

# 根癌农杆菌介导遗传转化稻曲病菌

张 震 杜新法\* 柴荣耀 毛雪琴 邱海萍 王艳丽 王教瑜 孙国昌\*

(浙江省农业科学院 植物保护与微生物研究所, 浙江 杭州 310021; \* 通讯联系人, E-mail: duxf@zaas.org; sungc@zaas.org)

## *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation of the Pathogen of *Ustilaginoidea virens*

ZHANG Zhen, DU Xin fa\*, CHAI Rong yao, MAO Xue qin, QIU Hai ping, WANG Yan li, WANG Jiao yu, SUN Guo chang\*  
(Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; \* Corresponding authors, E-mail: duxf@zaas.org; sungc@zaas.org)

Abstract: Conidia of *Ustilaginoidea virens* were transformed by a *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (AtMT) system using a binary plasmid vector pBIG2R HPH2 GFP GUS including *HPH* gene. AtMT yielded stable hygromycin B resistant clones (average 390-450 per  $10^6$  conidia), after pre culture strain C58C1 with acetosyringone (AS). The presence of the fragment of *EGFP* gene and *HPH* gene cassette in the transformants were checked by PCR method, and all tested transformants showed *EGFP* fluorescence in mycelium under 488 nm wavelength. It suggested that *Ustilaginoidea virens* was successfully transformed by AtMT method.

Key words: *Ustilaginoidea virens*; *Agrobacterium tumefaciens*; transformation

摘 要: 利用根癌农杆菌介导转化系统, 通过潮霉素抗性筛选转化子, 对稻曲病菌分生孢子进行了转化。农杆菌经乙酰丁香酮预先诱导, 转化效率大约为 390 ~ 450 个转化子/  $10^6$  个孢子。PCR 检测绿色荧光蛋白基因和潮霉素基因表达盒, 结果显示被测转化子基因组中均成功整合了目的基因片段。同时, 在 488 nm 下这些转化子都具有荧光。表明利用根癌农杆菌可以成功转化稻曲病菌。

关键词: 稻曲病菌; 根癌农杆菌; 遗传转化

中图分类号: Q933; S435.111.4+6 文献标识码: A 文章编号: 1001-7216(2006)04-0440-03

稻曲病[ *Ustilaginoidea virens* (Cooke) Tak.] 是世界主要稻作区普遍发生的一种病害。随着优良品种的更新和施肥水平的提高, 稻曲病引起的产量损失相当严重。此外, 稻曲病菌还可产生对人畜有害的毒素<sup>[1]</sup>, 混杂于病稻谷中易对人畜的健康造成直接危害。因此控制稻曲病的发生发展, 对水稻生产及稻米安全至关重要。目前对稻曲病的研究国内外已有不少报道, 主要集中在防治方面; 而关于稻曲病菌的分子遗传学的研究报道极少, 这些都限制了对其侵染过程和致病机制的深入认识。

目前, 通过 PEG 介导的原生质体法、REMI (restriction enzyme mediated integration) 和根癌农杆菌介导 ( *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation, AtMT ) 等方法已成功实现了多种丝状真菌的遗传转化<sup>[2-5]</sup>, 这些为研究植物病原真菌分子致病机制提供了参考<sup>[6]</sup>。其中根癌农杆菌介导的转化系统由于可以直接以真菌的孢子、菌丝为受体, 免除了 PEG 介导和 REMI 等转化方法中原生质体制备的复杂过程, 减少了转化的影响因素, 增加了转化稳定性和效率。利用这种方法已实现了对 *Magnaporthe grisea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum lagenarium*, *Helminthosporium turcicum* 等<sup>[3, 5, 7-9]</sup> 多种植物病原真菌的遗传转化。本研究报道了利用根癌农杆菌介导转化系统, 以绿色荧光蛋白 ( *EGFP* ) 为报告基因, 以潮霉素为选择性

标记, 对稻曲病菌进行遗传转化的过程。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株与质粒

稻曲病菌 Uv7, 由江苏省农业科学院陈志谊研究员提供。

根癌农杆菌 C58C1 (携带有质粒 pBIG2RHPH2 GFP GUS, 图 1), 由浙江大学宋凤鸣教授提供。

#### 1.2 引物与试剂

检测 *EGFP* 基因和潮霉素基因 ( *HPH* ) 表达盒的引物分别为 *EGFP* F: 5'-GCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3', *EGFP* R: 5'-GGGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3'; *HPH* F: 5'-CGGAATTCGACGTTAACTGATATTGAAGG-3', *HPH* R: 5'-CGTCTAGACGTTAACTGGTTCCCGGTCGGC-3', 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。抗生素、酶及其他相关生化试剂均购自上海鼎国生物技术有限公司。

---

收稿日期: 2005-11-11; 修改稿收到日期: 2006-02-08。  
基金项目: 浙江省科技计划项目 (2004C12020-5, 2005C22012)。  
第一作者简介: 张 震 (1978-), 男, 硕士, 研究实习员。

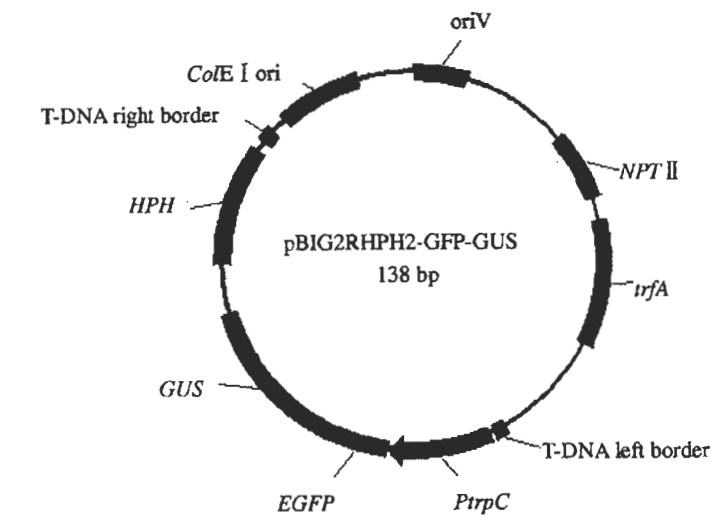


图 1 二元载体 pBIG2RHPH2-GFP-GUS  
Fig. 1. Binary vector pBIG2RHPH2-GFP-GUS.

1.3 稻曲病菌分生孢子培养

挑取新鲜的稻曲病菌菌丝块于 50 mL PS 液体培养基中,140 r/min,28℃下振荡培养 8 d 后,用灭菌双层纱布过滤获得薄壁分生孢子。

1.4 菌株转化

设以乙酰丁香酮诱导培养农杆菌(C58C1)6 h 和不进行诱导 2 个处理,然后进行遗传转化。具体转化方法参照 Gro-ot 等<sup>[10]</sup>。在选择性 PSA 平板(羧卞青霉素、头孢噻肟和潮霉素各 200 μg/mL)上 28℃下培养 7 d 后,挑取单菌落到选择性 PSA 固体培养基上培养保存。

1.5 真菌 DNA 的提取与转化子的检测

真菌 DNA 的提取采用 CTAB 法<sup>[11]</sup>。HPH 基因表达盒和 EGFP 基因的 PCR 检测程序为:94℃下预变性 4 min;94℃下变性 50 s,55℃下退火 40 min,72℃下延伸 2 min,34 个循环;72℃下延伸 6 min。

挑取转化子的菌丝涂片,用 Leica 荧光显微镜进行荧光观察。

2 结果与分析

2.1 潮霉素对稻曲病菌薄壁分生孢子萌发的影响

取 100 μL 浓度为 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> 个/mL 的稻曲病菌 Uv7 分生孢子涂在含不同浓度潮霉素的平板上,结果显示,

培养 7 d 后,在空白对照和含 50 μg/mL 潮霉素的平皿上长满了菌丝,而含 100 μg/mL 潮霉素的平皿上只长了少数几个菌落,含 150 和 200 μg/mL 潮霉素及以上浓度的平皿均无任何菌落形成。可见浓度为 150 μg/mL 的潮霉素就足以完全抑制稻曲病菌 Uv7 薄壁分生孢子萌发和菌落形成。

2.2 稻曲病菌转化子的获得

根癌农杆菌和稻曲病菌薄壁分生孢子在 IM 培养基上共培养 2 d 后,涂布选择性培养基培养 7 d 后便可看到单菌落形成。单菌落挑取到新的含有 200 μg/mL 潮霉素的平板上也能正常生长。结合几次转化结果,农杆菌预先经乙酰丁香酮诱导培养后的转化效率在 390~450 个转化子/10<sup>6</sup> 个孢子,未预先诱导的转化效率在 160~260 个转化子/10<sup>6</sup> 个孢子。

2.3 稻曲病菌转化子的检测

随机挑取 10 个转化子菌落,以野生型稻曲病菌株 Uv7 为对照,在 PS 液体培养基上培养 10 d 后,收集菌丝体提取基因组 DNA 进行 PCR 检测,10 个样品均扩增出 HPH 基因表达盒和 EGFP 基因片段(图 2)。

挑取转化子的菌丝制成玻片在 400 倍的 Leica 荧光显微镜下进行荧光观察,以野生原始菌株为对照。在 488 nm 波长下,观察到对照没有任何荧光,转化子菌丝能发出绿色荧光(图 3)。

3 讨论

稻曲病菌在全世界,尤其在亚洲某些稻区发病比较严重。但是目前对于稻曲病菌的分子遗传学的研究报道极少,也还没有建立起一个遗传转化系统,这些都限制了对其侵染过程和致病机制的认识。高效的遗传转化系统是研究植物病原菌致病机制的一种重要手段。利用根癌农杆菌介导的转化系统成功转化稻曲病菌,不但进一步验证了根癌农杆菌介导的转化系统对丝状真菌遗传转化的可行性,而且也找到了研究稻曲病菌致病分子机制的途径。同时,由于 pBIG2RHPH2-GFP-GUS 同时具有 EGFP 和 GUS 两个报告基因,有利于利用未改变致病性的突变体研究稻曲病的初侵染源,病菌在水稻植株上侵染部位及病菌侵入寄主后菌丝的活动寄生行为。

我们利用液体培养获得的稻曲病菌薄壁分生孢子进行

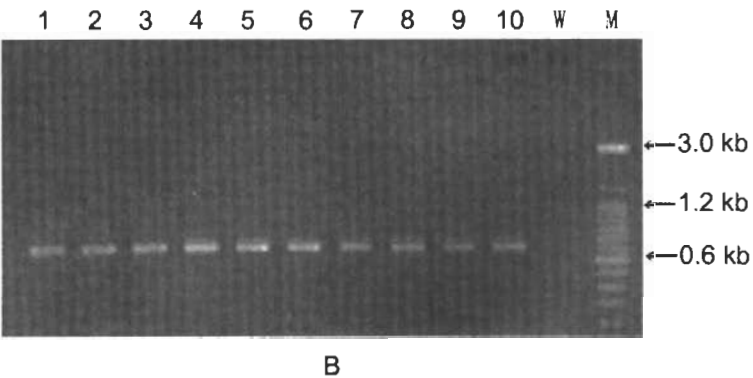
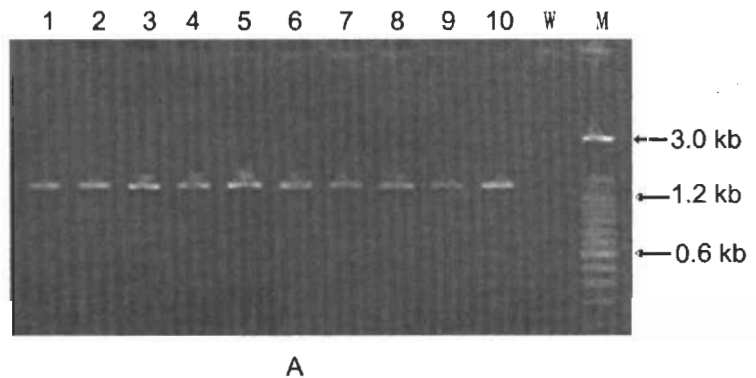


图 2 PCR 扩增检测随机挑取的稻曲病菌转化子中 EGFP(A)和 HPH(B)基因  
Fig. 2. PCR analysis of the EGFP gene(A) and HPH gene cassette(B) from ten randomly selected transformants of *U. vires*.  
M—Marker; 1~10 转化 DNA 的扩增产物; W—野生菌株对照。  
M, DNA ladder marker; Lanes 1 to 10, Transformants; W, Wild-type strain.





图3 绿色荧光蛋白在稻曲病菌转化子不同生长期的表达

Fig. 3. Expression of green fluorescent protein at different developmental stages of *U. virens*.

A和B分别是在荧光显微镜下转化子菌丝和萌发的厚垣孢子。

Sample A was assayed for green fluorescence in filament; Sample B was assayed for germination of chlamydospore and green fluorescence 24 h after inoculation in PSA medium.

遗传转化,农杆菌经乙酰丁香酮预处理可明显提高转化效率,但与其他真菌的转化效率(30~50个/10<sup>4</sup>个孢子)差距还很大<sup>[3]</sup>,这可能与菌株特性有关;可以通过优化转化条件部分提高转化效率<sup>[8]</sup>。此外,我们发现转化效率明显受到产孢时间的影响,产孢过长,效率明显下降,这正好与稻曲病菌薄壁分生孢子萌发特性相关<sup>[12]</sup>。对随机挑取的转化子进行PCR检测,结果显示有EGFP和HPH基因特异性片段出现,而且在488 nm波长下具有荧光表型。虽然没能进行Southern分析,不能确定插入的拷贝数,但是通过抗生素筛选、PCR检测和荧光观察相结合方式,可以证明T-DNA已成功地插入到了稻曲病菌基因组中。

#### 参考文献:

- [1] Nakamura K, Izumiyama N, Ohtsubo K, et al. Apoptosis induced in the liver, kidney and urinary bladder of mice by the fungal toxin produced by *Ustilagoidea virens*. *Mycotoxins*, 1993, 38: 25-30.
- [2] Bottin A, Larche L, Villalba F, et al. Green fluorescent protein (GFP) as gene expression reporter and vital marker for studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 176: 51-56.
- [3] Degefu Y, Hanif M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Helminthosporium turcicum*, the maize leaf-blight fungus. *Arch Microbiol*, 2003, 180: 279-284.
- [4] Lu S, Lyngholm L, Yang G, et al. Tagging mutations at the *Tox1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme mediated integration. *Proc Nat Acad Sci, USA*, 1994, 91: 12649-12653.
- [5] Mullins E D, Chen P X, Kang S, et al. *Agrobacterium* transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 2001, 91: 173-180.
- [6] Mullins E D, Kang S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58: 2043-2052.
- [7] Rho H S, Kang S, Lee Y H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Mol Cells*, 2001, 12(3): 407-411.
- [8] Tsuji G, Fujii S, Fujihara N, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. *J Gen Plant Pathol*, 2003, 69: 230-239.
- [9] Vijn I, Govers F. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Pathol*, 2003, 4(6): 459-467.
- [10] de Groot M J, Bundock P, Hooykaas P J, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotech*, 1998, 16: 839-842.
- [11] Talbot N J, Ebbole D J, Hamer J E. Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, 1993, 5: 1575-1590.
- [12] 张君成, 张炳欣, 陈志谊, 等. 稻曲病菌分生孢子的生物学研究. *植物病理学报*, 2003, 33(1): 44-47.