

稻曲病菌 T-DNA 插入突变体 B2510 的插入位点分析

丁慧^{1,2} 俞咪娜² 王亚会² 于俊杰² 尹小乐² 薄惠文^{1,2} 黄星¹ 刘永锋^{2,*}

(¹南京农业大学 生命科学学院, 南京 210095; ²江苏省农业科学院 植物保护研究所, 南京 210014; * 通讯联系人, E-mail: liuyf@jaas.ac.cn)

Molecular Characterization of *Ustilaginoidea virens* T-DNA Insertion Mutant B2510

DING Hui^{1,2}, YU Mi-na², WANG Ya-hui², YU Jun-jie², YIN Xiao-le², BO Hui-wen^{1,2}, HUANG Xing¹, LIU Yong-feng^{2,*}

(¹College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; * Corresponding author, E-mail: liuyf@jaas.ac.cn)

DING Hui, YU Mina, YU Junjie, et al. Molecular characterization of *Ustilaginoidea virens* T-DNA insertion mutant B2510. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(5): 541-551.

Abstract: To isolate the gene concerned with molecular pathogenic process of *Ustilaginoidea virens* (*U. virens*), T-DNA integration flanking sequence and the mutant genes of a mutant strain B2510 were analyzed. Compared with the wild-type *U. virens* strain P1, the pathogenicity of the mutant strain B2510 in the field was significantly decreased. The growth rate of B2510 on MM medium was slower than that of P1, but was not significantly different on PSA and TB₃ medium which were nutritionally endowed. The mutant strain B2510 did not produce conidiophores in PS broth medium. Genomic Southern bolt analysis confirmed that there were double T-DNA events inserted in genome of mutant strain B2510. The flanking *U. virens* sequences of T-DNA obtained by TAIL-PCR were adjacent in the wild type and with no sequences lost, and only a few bases of T-DNA were changed. The T-DNA insertion site was in the promoter region of *UV8b_1412* and downstream 3' region of *UV8b_1386*, respectively. RT-PCR analysis confirmed that the expression of both of two genes in B2510 were significantly decreased. The genes which were affected by T-DNA insertion may be associated with pathogenicity and participate in the regulation of pathogenic process of *U. virens* in rice.

Key words: *Ustilaginoidea virens*; T-DNA insertion mutant; ATMT transformation; pathogenicity; flanking sequence

丁慧, 俞咪娜, 王亚会, 等. 稻曲病菌 T-DNA 插入突变体 B2510 的插入位点分析. 中国水稻科学, 2016, 30(5): 541-551.

摘要: 以稻曲病菌 T-DNA 插入突变体库中致病力减弱突变菌株 B2510 为材料, 通过分析 T-DNA 插入位点的侧翼序列和突变基因, 分离出在稻曲病菌致病过程中起作用的基因。通过测定突变菌株 B2510 的生长速率、产孢能力及致病力发现, 与野生型菌株 P1 相比, B2510 田间接种表现为致病性减弱; 在 MM 培养基上生长速率下降, 而在 PSA 和 TB₃ 培养基中生长速率与野生型没有显著差异, 但丧失产孢能力。Southern 杂交显示 T-DNA 在突变菌株 B2510 中以双拷贝形式插入, 利用 TAIL-PCR 技术扩增紧邻 T-DNA 两侧的侧翼序列, 经过比对分析发现, T-DNA 分别插在基因 *UV8b_1412* 的启动子区域和 *UV8b_1386* 的下游 3' 端, 且稻曲菌基因组序列均未丢失, T-DNA 上只有几个碱基发生变化。半定量 RT-PCR 分析基因的表达情况, 显示两个基因在突变体 B2510 的表达量较 P1 均显著下降, 推测 T-DNA 插入位点处的基因与稻曲病菌致病性相关, 可能在某一阶段参与调控稻曲病菌在水稻上的致病过程。

关键词: 稻曲病菌; T-DNA 插入突变; ATMT 转化; 致病力; 侧翼序列

中图分类号: Q343.5; S435.111.4⁺6

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2016)05-0541-11

水稻稻曲病是一种穗部病害, 随着气候的变化、施肥水平的增加等一些因素^[1], 稻曲病发生频率上升, 危害日益加重, 已由次要病害上升为主要病害。

稻曲病菌(*Ustilaginoidea virens*) 侵染稻粒可形成褐色至墨绿色的稻曲球, 造成空秕率上升、千粒重下降, 严重影响水稻品质和产量^[2, 3]。而且稻曲球中

收稿日期: 2015-12-31; 修改稿收到日期: 2016-03-25。

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金资助项目[CX(15)1054]; 国家自然科学基金资助项目(31301624)。

还有稻曲菌素^[4, 5],能抑制微管蛋白组装,干扰细胞骨架形成,对人畜产生危害。因此,深入了解稻曲病的致病机理,可为抗病水稻的育种和新靶标药剂的开发提供理论依据。

目前,稻曲病菌的研究大都集中在其生物学特性^[6]、侵染循环^[7, 8]和病害防治^[9, 10]及稻曲毒素^[5, 11, 12]等方面,而对稻曲病菌的致病机理方面的了解比较缺乏。张震等^[13]根据稻瘟病菌中 *PMK1* 的保守序列,克隆到了稻曲病菌的 *UVMK1* 基因,同时在稻瘟病菌中进行了功能验证;此外还通过构建稻曲病菌的 cDNA 文库,克隆到参与致病和防御过程中的 *R5* 基因^[14]。刘联盟等^[15]根据丝状真菌 G 蛋白 β 亚基编码基因的同源保守序列设计简并引物,结合 TAIL-PCR 技术获得了其序列,为稻曲病菌致病机理的进一步研究奠定基础。利用农杆菌介导的遗传转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)是分离与鉴定病原菌的致病相关基因的一种有效途径^[16]。通过 ATMT 方法将 T-DNA 随机插入到真菌的基因组中,构建突变体库,并根据突变体的表型筛选获得相关功能基因,已经在多个真菌中实现。Nakamura 等^[17]通过筛选刺盘孢菌(*Colletotrichum sansevieriae*)ATMT 突变体库,研究了病原菌的致病相关基因;吴小燕等^[18]通过筛选稻瘟病菌 ATMT 库,获得一株致病性增强的菌株,成功克隆并分析了相关基因 *MgThiJ1*。稻曲病菌的 ATMT 方法也成功建立^[19]。于俊杰等^[20]研究分生孢子高产 ATMT 突变菌株 A2588,克隆到相关基因,并分析该基因在稻曲病菌分生孢子形成中的功能。俞咪娜等^[21]通过筛选得到致病力增强菌株 5062,克隆和分析了 T-DNA 插入区域的相关基因,为稻曲病菌致病机理的解析、致病相关基因克隆奠定基础。王亚会等^[22]对致病力丧失突变菌株 B1464 从生物学形态和分子遗传变异方面进行分析,发现 T-DNA 的插入导致了染色体重排,并破坏了 C2H2 锌指蛋白、苹果酸合成酶等基因的正常表达。

为深入认识稻曲病菌在水稻上的侵染和致病机制,我们通过研究农杆菌介导的 T-DNA 插入稻曲病菌致病力减弱突变体 B2510 的生物学特性,并利用 TAIL-PCR 技术克隆 B2510 基因组的 T-DNA 插入位点侧翼序列,RT-PCR 检测突变基因表达量变化,分离并解析了可能与稻曲病菌致病相关的新的基因,在分子水平上为水稻抗稻曲病菌的育种和

稻曲病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与水稻

稻曲病菌的野生菌株 P1,分离自田间自然发病的稻曲球上并取单胞菌株保存。致病力减弱突变菌株 B2510(由本实验室通过农杆菌介导转化 P1 得到一个突变体库,并经过田间致病力测验筛选获得),均由江苏省农业科学院植物保护研究所水稻病害与生物防治实验室保存。稻曲病菌 ATMT 突变体获得的具体方法参照 Mullins 等^[23]的方法进行。常规 DNA 片段转化用的大肠杆菌 *E. coli* trans T1 购自北京全式金生物技术有限公司。

稻曲病菌致病性检测采用感病水稻品种两优培九。

1.2 试剂

本研究的引物合成(表1)及测序由 Invitrogen 公司完成;限制性内切酶 *Sal* I、*Hin* dⅢ 和 RNA 提取用的 Trizol、用于 RT-PCR 的 RNA 反转录酶(PrimeScript Reverse Transcriptase)均购自 TaKaRa 公司;PCR 所用的 *Taq* DNA 聚合酶和连接所需的 pEASY-T1 载体均购自北京全式金生物技术有限公司;Southern 杂交试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I)购自 Roche 公司,杂交用的带正电荷尼龙膜(Hybond N+)购自上海索莱宝生物科技有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自东盛生物科技有限公司。其他生化试剂购于美国的 Sigma 公司或国产分析纯。

1.3 稻曲病菌突变体表型测定

取保存的原始菌株 P1 和突变菌株 B2510,分别接种至 PSA 固体培养基(200 g/L 马铃薯煮汁,20 g/L 蔗糖,12 g/L 琼脂)上活化,28℃ 培养 15 d 后,在菌落生长边缘处取菌碟(打孔器内径为 3.5 mm),用于生物学特性、致病力测定。以上各处理均设 3 次重复。

1.3.1 菌株生长速率测定

取上述菌碟,分别接至 PSA、TB₃、MM 固体培养基上,28℃ 避光培养 20 d 后观察菌落形态,测量菌落直径,每个处理重复 3 次。

1.3.2 菌株分生孢子和菌丝形态观察

分别将 P1 和突变菌株 B2510 接种至含 50 mL PS 液体培养基的 100 mL 三角瓶中,130 r/min 摇培 7 d,通过显微镜(10×40)观察分生孢子数量和

表 1 引物列表

Table 1. Primers applied in the research.

引物名称	引物序列
Name	Sequence(5' → 3')
hyg1.4F ^[21]	ACAGAAGATGATATTGAAGGAGC
hyg1.4R ^[21]	TACTCTATTCCTTTGCCCTCG
LAD8 ^[21]	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVVNVNNNACGTG*
LAD10 ^[21]	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNNNNNGGTT*
GFP-1 ^[21]	CCATCCTGGTCGAGCTGGA
GFP-2 ^[21]	CGAACTCCAGCAGGACCATG
GRB3 ^[21]	TGGGCACCACCCCGGTGAACAGCTC
HLB1 ^[21]	GATTCCCAATACGAGGTCGCCAA
HLB2 ^[21]	TGGAGGCCGTGGTTGGCTTGTATGGAG
HLB3 ^[21]	AGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGA
AC-S2 ^[21]	GAGTTTAGGTCCAGCGTCCGTCGACGATGGACTCCAGAG
AC-S3 ^[21]	GAGTTTAGGTCCAGCGTCCGT
8H1	CGAGTTCCAACAGACCCCTA
8R1	ATGGCCAAACTTCAACCCTT
10H1	ATGGACCAGCCACAACATAAA
10R1	TGTCAAAGATGCAAGGTCA
RT-1F	GACCTTTTGTTCGAGCCAT
RT-1R	GTCTTTGGCGGGTTTATCAG
RT-U-1	ACCGCTTCAGCAGATGGG
RT-U-2	GGCGTCTGCTACTCGCTCTA
RT-D-1	GTCCCTCAGGTCGCAATAG
RT-D-2	TAAGTTCCCTCCCACCAGCC
α-tubulin2F ^[24]	GGCGTTTACAATGGCACTTC
α-tubulin2R	CGGAACAGTTGACCAAAAGG

* B=T, C or G; N=A, T, C or G.

测量菌丝直径,每次取 10 段不同菌丝。

1.4 菌株致病性测定方法

参考张君成等^[24]的稻曲病菌接种方法,取 1.3 中所用野生菌株 P1 和突变菌株 B2510 的菌碟各 2 个,分别接种至 PS 培养液振荡培养,7 d 后将含有孢子和菌丝的混合培养液接种水稻感病品种两优培九。每个菌株接 10 穗,每穗接种 1 mL 菌丝和孢子混合培养液。接种试验重复 3 次,分别接种于 2014 年 8—9 月江苏省农业科学院试验田内 3 个批次的水稻,21 d 后调查水稻的发病情况。

1.5 PCR 检测和 Southern 杂交

接种菌丝块置于 50 mL PS 培养液中,28 ℃、180 r/min 下振荡培养 7 d 后收集菌丝体,采用 CTAB 法提取菌株基因组 DNA。以 P1 为对照,PCR 检测突变体中的绿色荧光蛋白基因 *GFP* (扩增引物为 GFP-1 和 GFP-2)和潮霉素磷酸转移酶基因 *HPH* (扩增引物为 hyg1.4F 和 hyg1.4R)^[21]。反应体系如下:2.5 μL 10×TransTaqHiFi PCR 缓冲液,2 μL dNTPs(2.5 mmol/L),引物各 1 μL,0.5 μL

HiFi DNA 聚合酶(5 U/L),1 μL 基因组 DNA,去离子水补齐 25 μL。PCR 条件:94℃下预变性 4 min,94℃下 30 s,60℃下 60 s,72℃下 1.5 min (35 个循环),72℃下 10 min。用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测结果。

用引物 hyg1.4F 和 hyg1.4R 进行 PCR,扩增 pCAMBIA1300 质粒中的 *HPH* 基因片段,回收产物。参照 Southern 杂交试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I),将回收产物用 DIG 标记作为探针,使用终浓度为 25 ng/mL。将约为 5 μg B2510 和 P1 的基因组 DNA 分别用 *Sal* I、*Hind* III 单酶切过夜后,经过 0.8%琼脂糖凝胶电泳分离,通过盐桥法将 DNA 转移到尼龙膜上,DNA 通过紫外交联固定在尼龙膜上后,参照上述试剂盒提供的方法对附有 DNA 的尼龙膜进行预杂交、杂交,洗涤,显色。

1.6 突变菌株侧翼序列的克隆及分析

利用 TAIL-PCR(Thermal Asymmetric Interlaced-PCR)法,采用简并引物 LAD8 和 LAD10 和

特异性引物 HLB1 / HLB2 / HLB3 扩增插入的 T-DNA 片段的 LB 端邻接稻曲病菌序列,以稻曲病菌基因组 DNA 为模板扩增突变菌株 T-DNA 插入位点的侧翼序列。TAIL-PCR 方法参照 Mullins 等^[23],具体引物序列见表 1。

根据插入位点两端的侧翼序列分别设计引物 8H1/8R1 和 10H/10R1。反应体系如下: 5 μ L 10 \times TransTaqHiFi PCR 缓冲液, 4 μ L dNTPs (2.5 mmol/L), 引物各 1 μ L, 0.5 μ L HiFi DNA 聚合酶 (5 U/L), 1 μ L 基因组 DNA, 去离子水补齐 50 μ L。PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 下预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 下 30 s, 60 $^{\circ}$ C 下 60 s, 72 $^{\circ}$ C 下 4 min (35 个循环), 72 $^{\circ}$ C 下 10 min。使用的引物分别是 8H1/8R1, GRB3/ 8R1 和 10H1/10R1, GRB3/10R1, PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收(参照说明书), 测序。

RT-PCR 选用的 RNA 提取选用摇培 4 d 的菌丝体, 采用 Trizol 法提取野生型菌株 P1 和突变菌株 B2510 的总 RNA。RNA 反转录方法参照试剂盒说明书。测序结果参照稻曲病菌的全基因组序列以及转录组序列, 进行序列相似性比对和分析采用

NCBI 网站 BLAST、ORF Finder 等程序完成。

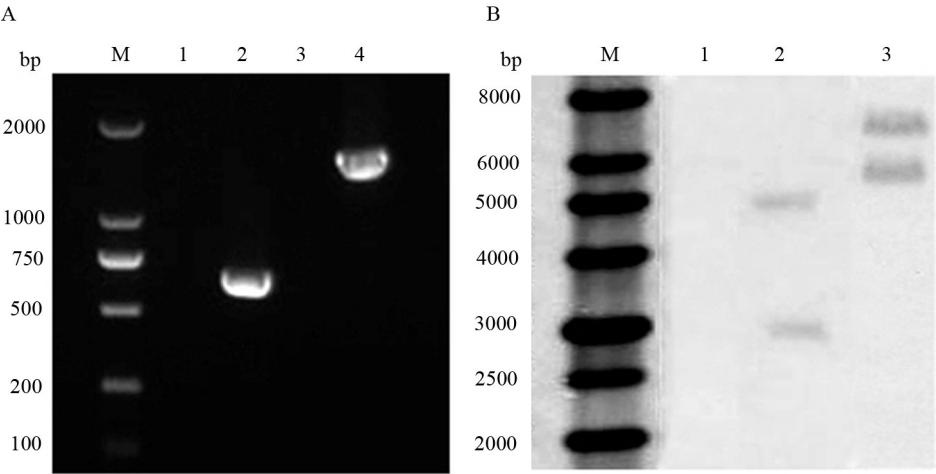
2 结果与分析

2.1 突变菌株分子检测

为了确定 T-DNA 是否稳定地插入突变菌株中, 将突变菌株在无潮霉素的 PSA 平板上经 5 轮传代培养后, 再用 CTAB 法分别提取野生型菌株 P1 和突变菌株 B2510 基因组 DNA, 通过引物 GFP-1/ GFP-2 和 hyg1.4F/hyg1.4R 分别对其进行 PCR 检测, 扩增出约 600 bp 和约 1 400 bp 长的 GFP 基因和 HPH 基因片段(图 1-A), 而在野生型菌株 P1 中没有扩增到条带。Southern 杂交检测 T-DNA 在突变菌株 B2510 的拷贝数, 结果表明 T-DNA 已经整合到稻曲病菌基因组中, 且突变体中的 T-DNA 为双拷贝插入(图 1-B), 这有利于后续 T-DNA 插入位点的分析和相关基因功能的研究。

2.2 突变菌株 B2510 致病力减弱

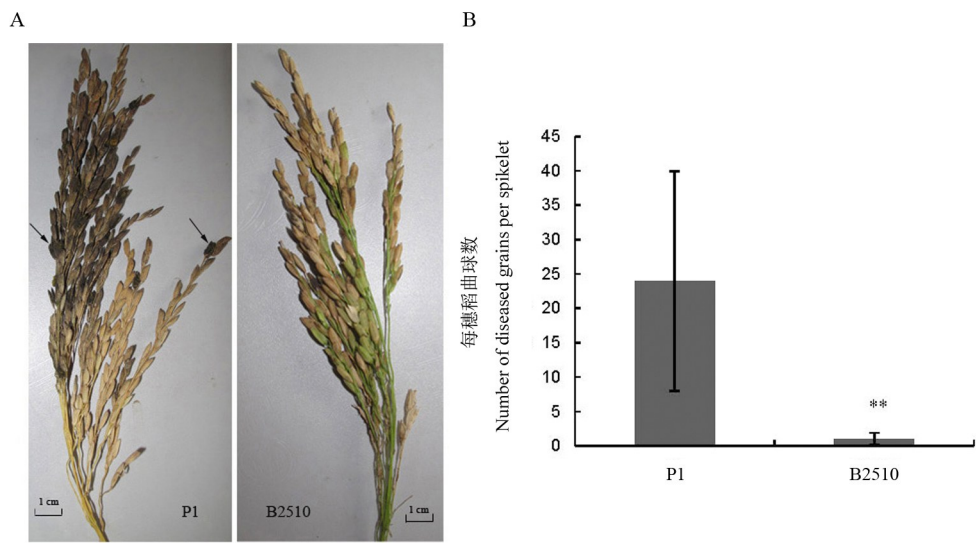
田间分别接种突变菌株 B2510 和野生型菌株 P1 的菌丝和孢子混合液, 21 d 后调查发现, 接种突变菌株 B2510 的水稻平均每穗有 2 个病粒, 而接种



A—PCR 检测, 其中泳道 1、3 分别为以 P1 为模板检测 GFP 基因和 HPH 基因; 泳道 2、4 分别为以 B2510 为模板检测 GFP 基因和 HPH 基因。B—Southern 杂交检测, 其中泳道 1 为 P1 基因组 Sal I、Hind III 双酶切后 HPH 基因 Southern 杂交; 泳道 2、3 分别为 B2510 基因组 Sal I、Hind III 酶切后 HPH 基因 Southern 杂交。

A, PCR analysis of the GFP gene and HPH gene. Lanes 1 and 2, PCR detection of the GFP genes of P1 and B2510, respectively. Lanes 3 and 4, PCR detection of the HPH of P1 and B2510. Lane M, DNA marker; B, Southern blot detection of B2510, showing that a double T-DNA insertion event occurred in the B2510 genome. Lane 1, Genomic DNA of P1 was digested with Sal I and Hind III. Lanes 2 and 3, Genomic DNA of B2510 was digested with Sal I, Hind III, respectively.

图 1 稻曲病菌突变菌株 B2510 的分子检测
Fig. 1. Molecular detection of mutant strain B2510.



A—突变菌株 B2510 接菌稻穗上的稻曲球数显著少于野生菌株 P1。粗箭头所指为稻曲球；B—突变菌株 B2510 和野生菌株 P1 分别接种两优培九后病粒数统计。* 表示极显著性差异, $P < 0.05$ 。

A, Number of diseased grains caused by the mutant strain B2510 was significantly decreased than that of wild strain P1. The coarse black arrows indicate false smut balls; B, Statistical analysis of the number of diseased grains per panicle on Liangyoupeijiu. ** shows significant difference at 0.05 level.

图 2 突变菌株 B2510 的致病性测定

Fig. 2. Pathogenicity test of the mutant strain B2510.

菌株 P1 的水稻平均每穗有 25 个病粒,即突变菌株 B2510 的致病能力减弱(图 2)。由此推测,外源 T-DNA 的插入可能影响到某个致病相关的正调控基因,从而减弱了菌株在水稻上的致病能力。

2.3 突变菌株表型分析

将突变菌株 B2510 与野生菌株 P1 分别接种在 PSA、TB₃、MM 培养基上培养 20 d 后测量菌落直径。突变菌株 B2510 在营养较丰富的 PSA 和 TB₃ 培养基上,与野生型菌株 P1 相比,生长速率和菌落色泽没有显著差异,但其菌落形态上明显不同,菌丝生长得更致密且生成褶皱。在 MM 培养基上,突变菌株 B2510 的菌落形态与野生型菌株 P1 相比,菌丝没有径直往外延伸,从而显得更稠密。B2510 的生长速度较慢,菌落直径为 18.81 mm,野生菌株 P1 对应的菌落直径为 25.92 mm(图 3-A、B),两菌株在生长速率上差异极显著。

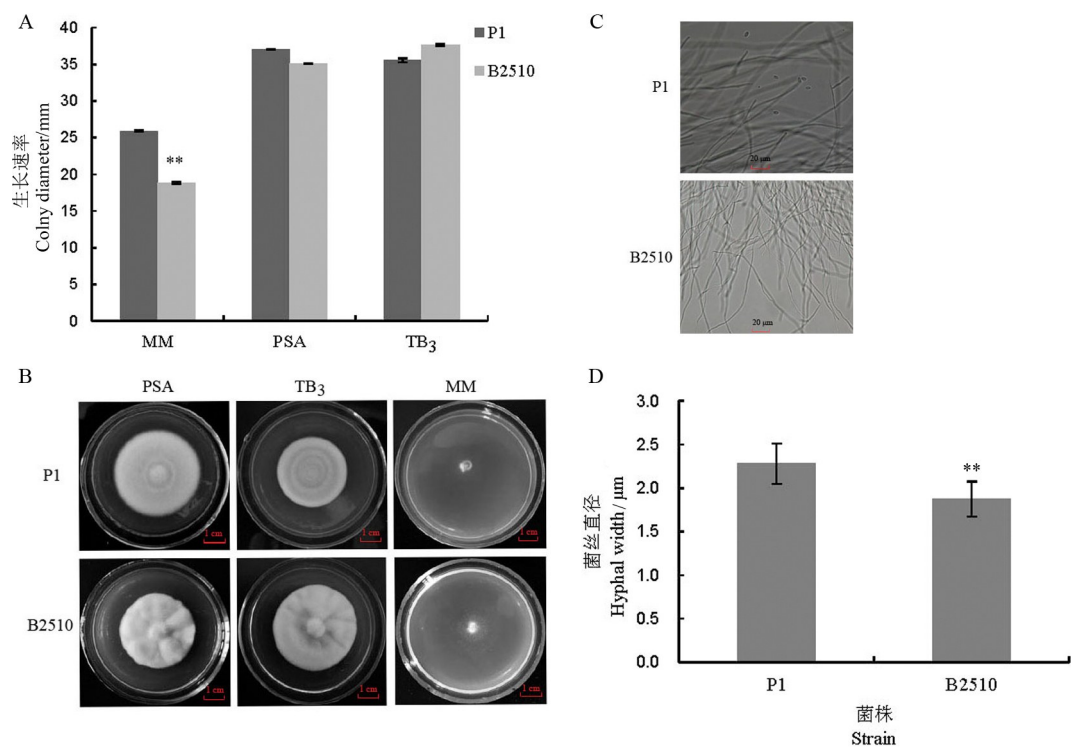
将 B2510 和 P1 分别进行液体 PS 培养液摇培,6 d 后,取菌液用血球计数板计算产分生孢子量,并观察孢子形态。结果显示,突变菌株 B2510 不产生分生孢子,只产生菌丝(图 3-C)。通过显微镜测量比较后发现(图 3-D),B2510 的菌丝比 P1 小,且差

异极显著。由此推测,T-DNA 的插入可能破坏了 B2510 基因组营养吸收、运输或利用相关基因,使其不能正常地使用环境中的营养物质,导致生长速率下降,产孢能力降低,菌丝生长异常,从而使其致病能力减弱。

2.4 突变菌株 T-DNA 插入位点侧翼序列克隆与分析

TAIL-PCR 是克隆 T-DNA 插入位点侧翼序列的一种有效方法。首先,分别以 P1 和 B2510 的基因组 DNA 为模板,使用 T-DNA 特异性引物 HLB1/HLB2/HLB3 和简并引物 LAD8 和 LAD10 扩增 T-DNA 的 LB 端侧翼序列,得到长度分别为 959 bp 和 1055 bp 的两段特异序列。将得到的两段序列与农杆菌双元载体和稻曲病菌基因组序列进行比对(图 4-A),发现突变菌株中两个 T-DNA 的 LB 端都只有末端 4~6 个碱基发生变化,获得稻曲病菌基因组上序列长度分别为 55 bp 和 210 bp。

将上述获得的两段 T-DNA 侧翼序列与稻曲病菌全基因组序列进行比对。根据得到的序列设计引物 8R1 和 10R1,分别与引物 GRB3 扩增 P1 和 B2510 基因组,得到插入位点的 RB 端序列分别为



A—突变菌株 B2510 与野生菌株 P1 在 MM、PSA 和 TB₃ 这三种不同培养基上菌落直径的比较。在 MM 培养基中突变菌株 B2510 的生长速率明显慢于 P1,且差异极显著;B—突变菌株 B2510 与 P1 分别在 MM、PSA 和 TB₃ 不同培养基上的菌落形态,图中标尺=1 cm;C—在显微镜(10×40)下观察到的突变菌株 B2510 与 P1 孢子和菌丝,标尺=20 μm;D—突变菌株 B2510 与 P1 菌丝直径的比较。

A, Difference of colony diameters between mutant strain B2510 and wild-type strain P1 on MM, PSA and TB₃ medium. The growth rate of B2510 was significantly slower than that of P1; B, Colonies of mutant strain B2510 and P1 on different media; bar=1 cm; C, Analysis and comparison of conidium and hypha between mutant strain B2510 and P1 under microscope (10×40); bar=20 μm; D, Comparison of the sizes of hypha between mutant strain B2510 and P1.

图 3 突变菌株 B2510 和野生菌株 P1 的菌丝生长及产孢特性分析

Fig. 3. Analysis of colonies and sporulation of mutant strain B2510 and wild-type strain P1.

500 bp 和 300 bp 左右(图 4-B、C),比对发现 T-DNA 和稻曲基因组都没有发生碱基丢失。

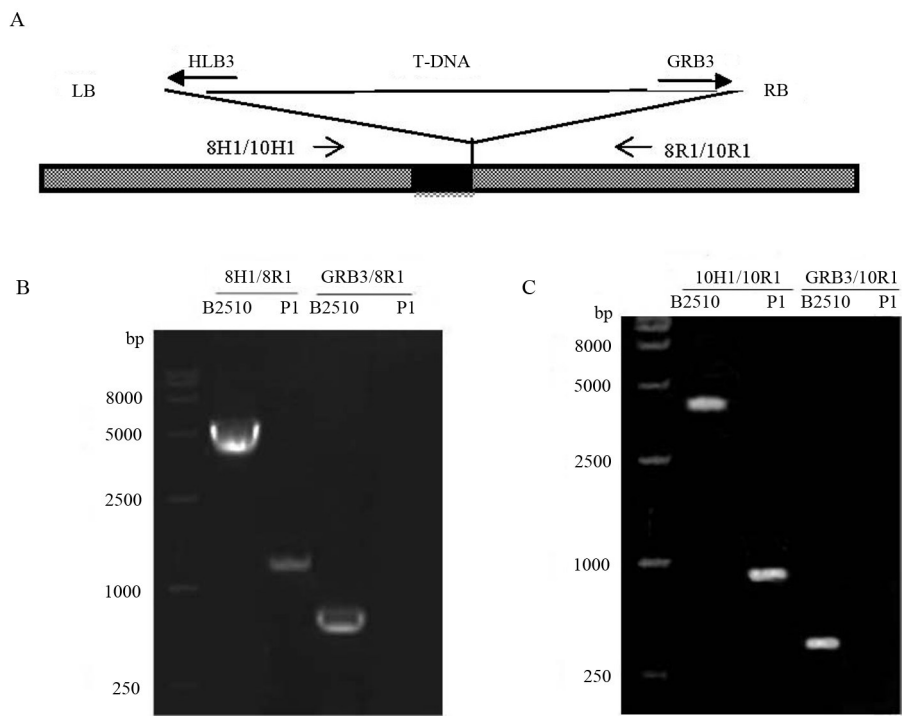
根据上述得到的序列,设计引物 8H1、10H1,分别和 8R1、10 R1 以 P1 和 B2510 基因组为模板进行 PCR 扩增。结果在 B2510 基因组中能扩到约 4 kb 的条带,经测序验证为目的片段;而在 P1 基因组中分别扩增到 1500 bp 和 1000 bp 左右的片段(图 4-B、C),经测序验证为稻曲病菌的序列。

2.5 突变菌株 T-DNA 插入位点侧翼基因分析

将 T-DNA 插入的两个侧翼序列分别与稻曲病菌全基因组序列比对,得到两个基因即 *UV8b_1412* 和 *UV8b_1386*。BioEdit 分析 T-DNA 插入位点,发现在 *UV8b_1412* 基因中 T-DNA 插入到 5' 上游区域,距起始密码子 1069 bp(图 5-A、B),Promoter 2.0 Prediction 预测显示 T-DNA 插入位点很有可

能是启动子区域。在 *UV8b_1386* 基因中 T-DNA 插入在距终止密码子 400 bp 左右处。提取 PS 培养液中摇培 5 d 的稻曲病菌菌丝的 RNA,使用 RT-1F/RT-1R 和 α -tubulin2F/ α -tubulin2R 引物对基因组表达量进行半定量 RT-PCR 检测,结果表明 *UV8b_1412* 基因表达水平明显降低(图 5-C),推测该基因表达水平降低可能是导致产孢能力丧失、致病力减弱的原因之一。以同样的方法设计引物 RT-U-1/RT-U-2 和 RT-D-1/RT-D-2 检测 *UV8b_1386* 基因的表达水平,发现插入位点基因 5' 端能正常表达,而 3' 端不表达(图 5-D),推测该基因在突变体中不能形成完整的蛋白。

进一步分析两个基因 *UV8b_1412* 和 *UV8b_1386*,发现 *UV8b_1412* 编码区全长 3646 bp,含有两个分别为 1278 bp 和 91 bp 内含子,基因编码一



A—突变体 B2510 中 T-DNA 插入的结构以及各引物在基因组上的位置；B,C—PCR 验证 T-DNA 插入位点处右端的侧翼序列，并分析 T-DNA 插入后的基因组序列变化。

A, Schematic diagram of T-DNA insertion event in mutant B2510 and the positions of primers on genome; B and C, Analysis of T-DNA right border flanking region and genome sequence after T-DNA insertion using PCR.

图 4 突变菌株 B2510 T-DNA 插入位点侧翼序列的扩增与分析

Fig. 4. Cloning and analysis of T-DNA flanking region in mutant strain B2510.

个含 758 个氨基酸的 C6 转录因子 (GenBank: KDB17528.1) 蛋白。将该蛋白与一些植物病原真菌中同源蛋白进行氨基酸同源序列比对和系统发育树分析,发现稻曲病菌中的 C6 转录因子与其他真菌的同源性都很低,最高的是白僵菌 (*Beauveria bassiana*),为 43%,可以看出 UV8b_1412 编码的 C6 转录因子在稻曲病菌中有一定的独特性 (图 6-A)。

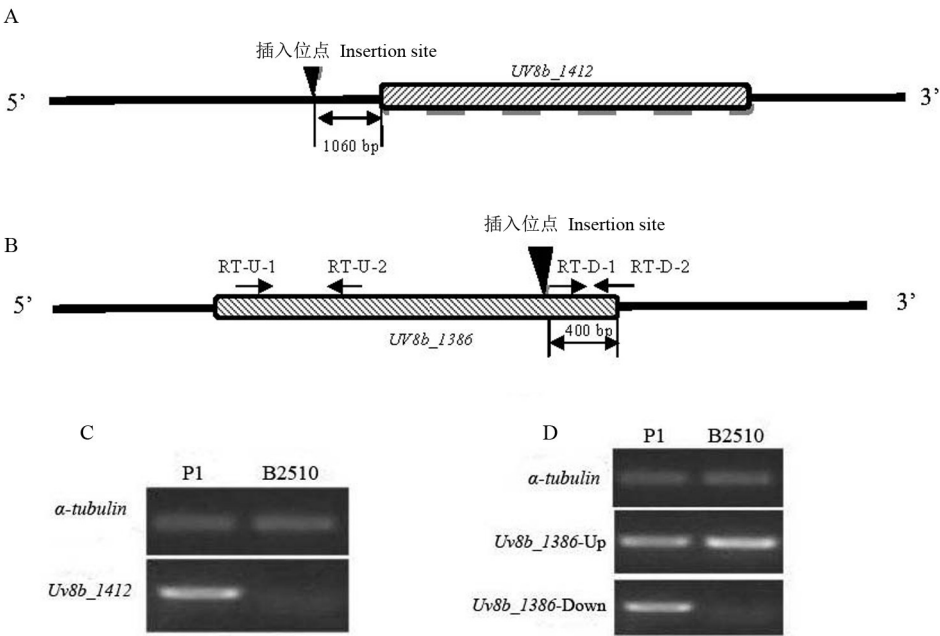
UV8b_1386 编码区全长 2691 bp,含有 4 个分别为 128 bp、88 bp、66 bp 和 78 bp 的内含子,CDS 序列编码一个含 776 个氨基酸的类 RasGTP 酶激活蛋白 (GenBank: KDB17502.1)。通过与一些真菌同源蛋白的氨基酸序列比对和系统发育树分析发现 (图 6-B),其 RasGTP 酶激活蛋白与绿僵菌的同源性最高 (96%),亲缘关系最近;且与其他真菌的同源性也很高,与里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、冬虫夏草 (*Ophiocordyceps sinensis*) 和尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 的同源性分别为 92%、

90% 和 92%;与稻瘟病菌同源性最低,也达到 88%,说明该蛋白在真菌生物中非常保守。

3 讨论

T-DNA 插入突变已经成为标记和分析功能基因的一种有效途径,并广泛应用于植物、丝状真菌等生物。本研究的菌株 B2510 就是通过该方法转化野生型菌株 P1 筛选获得的。通过生物学特性及 T-DNA 插入位点侧翼基因的分析,发现其在营养缺乏的条件下生长速率下降,说明 T-DNA 插入在一定程度上影响了营养的运输,这可能与致病力的减弱有关。

目前,对于稻曲病菌的传播与侵染过程方面比较认可的观点是,稻曲病菌以菌核、厚垣孢子等形式在田间或稻种上越冬,次年在适宜条件下萌发,在芽期、苗期或孕穗期侵染水稻,或是随风飞散的各种形式的孢子落在孕穗期叶鞘内或直接侵染花器致



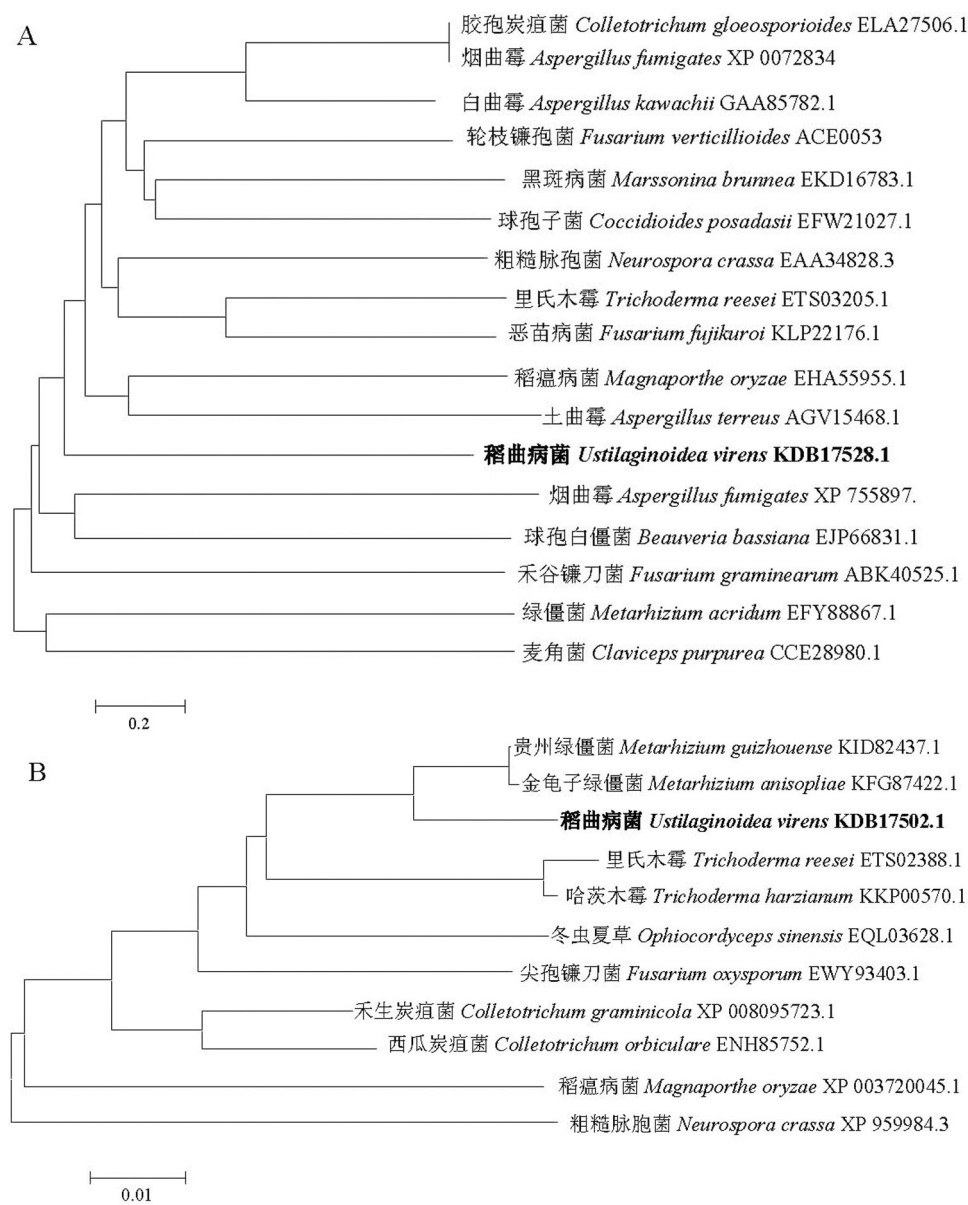
A,B—两个基因中 T-DNA 插入位置; C,D—RT-PCR 检测突变菌株 B2510 中两个基因的表达变化, α -tubulin 为内参基因。D 中 *Uv8b_1386*-Up 指的是该基因 5'端的表达量,*Uv8b_1386*-Down 则是基因 3'端的表达量。
A and B, Schematic diagram of T-DNA insertion event in the two genes; C and D, RT-PCR analysis of the expression level of the two genes in mutant strain B2510, α -tubulin was used as the reference gene. In Fig.5-D, *Uv8b_1386*-Up indicates the expression of 5' flanking region of *Uv8b_1386*, and *Uv8b_1386*-Down, the expression of the gene 3' flanking region.

图 5 稻曲病菌突变菌株 B2510 中 T-DNA 插入位点侧翼基因分析
Fig. 5. Analysis of T-DNA flanking gene in *U.virens* mutant strain B2510.

病^[2, 24]。张君成等^[24]认为采用稻曲病菌分生孢子和菌丝混合液对水稻接种,可以得到较高的发病率,且在一定范围内孢子浓度越高越容易发病;李燕等^[25]也证明了稻曲病菌的产孢量与致病力正相关,表明稻曲病菌的分生孢子在其侵染过程中起着重要作用。本研究中的 B2510 突变体丧失产孢能力,其致病力减弱,验证了上述研究结果,同时也从另一方面说明单独的稻曲病菌菌丝也可以侵染水稻并形成稻曲球。

C6 转录因子是一种类似 GAL4 调控的 Zn2Cys6 锌指蛋白类转录因子。Zn2Cys6 基序中的半胱氨酸与 2 个锌离子结合,因而命名为 Zn2Cys6 锌指蛋白,这类蛋白仅存在于真菌中,可参与调节真菌的基础代谢、次级代谢、药物抗性、减数分裂等过程,对其生长发育起到一定的影响^[26]。C6 转录因子属于真菌转录因子 MHR 超级家族,调控中间包含一个 N 端 C6 双核簇结构的同源区域^[27, 28]。在

稻瘟病菌上敲除该类转录因子,有部分突变体表现为生长速率减慢,产孢量减少,孢子萌发率及附着胞形成率降低,致病力减弱,说明 Zn2Cys6 锌指蛋白类转录因子在一定程度上影响着稻瘟病菌的生长发育及致病性^[29]。链孢霉中也发现一类 GAL4 类型的 C6 锌指簇蛋白,是在分生孢子的萌发和生长调节过程中一种必需的转录因子^[30]。Ras-GTP 酶激活区域被称为 RasGAP^[31, 32],它绑定在 Ras-GTP 酶上,促进 GTP 水解为 GDP^[33]。RasGTP 酶在一些信号通路中作为分子开关,且当 GAP 活性降低时,信号传递会延迟^[34]。在曲霉属和镰刀菌属中孢子形成和毒素产生都是在 G 蛋白信号通路上被调控的^[35, 36],RasGAP 是 G 蛋白信号通路上的一个重要组成部分,因此也间接对真菌的生长起到一定的调控作用。突变体 B2510 不能产生分生孢子,且菌丝直径比 P1 小,可能是由于 GAP 蛋白被破坏,使细胞中的某种物质不能特异性结合在 GAP 区域,



A—通过 MEGA6 程序计算其分散距离,制作稻曲病菌的 C6 转录因子与其他 16 种不同真菌同源蛋白的系统发育树;每个菌株后的号码与 GenBank 中登记的一致。B—通过 MEGA6 程序计算其分散距离,制作稻曲病菌的类 RasGTP 酶激活蛋白与其他 10 种不同真菌同源蛋白的系统发育树;每个菌株后的号码与 GenBank 中登记的一致。

A, Phylogenetic tree of C6 transcription factor of *U. virens* and 16 other species was constructed by observed divergency distance method in the program MEGA6. Numbers correspond to GenBank accession numbers. B, Phylogenetic tree of GTPase-activator protein for Ras-like GTPase containing protein of *U. virens* and 10 other species was constructed by observed divergency distance method in the program MEGA6. Numbers correspond to GenBank accession numbers.

图 6 基于蛋白氨基酸序列的稻曲病菌及其他多种真菌的系统发育分析

Fig. 6. Phylogenetic tree of *U. virens* and several fungi based on amino acid sequence of proteins.

导致传递信号的通路受阻,影响细胞骨架的形成和物质的运输,从而对细胞的生长起到一定的抑制作用。

本研究从稻曲病菌 T-DNA 插入突变体库中筛选得到一株致病力减弱突变体 B2510。对突变体 B2510 的生物学和分子生物学研究发现其与野生型

相比表现为:丧失产孢能力,菌丝直径变小;T-DNA双拷贝插入基因组,且分别插在基因 *UV8b_1412* 的启动子区域和 *UV8b_1386* 的下游 3'端;两个基因在突变体中的表达量均下降。由于 T-DNA 插入破坏了两个基因,可能是单个基因或是两个基因共同作用使突变体 B2510 的表型发生变化,要明确各个基因的功能,还有待后续通过基因敲除等方法进行进一步研究。

参考文献:

- [1] 王文斌,尹小乐,李燕,等.影响稻曲病严重度主要因素的研究.西南农业学报,2014,7(3):1067-1071.
Wang W B, Yin X L, Li Y, et al. Study on main factors affecting severity of false smut. *Southwest China J Agric Sci*, 2014, 7(3): 1067-1071.
- [2] 胡东维,王疏.稻曲病菌侵染机制研究现状与展望.中国农业科学,2012,45(22):4604-4611.
Hu D W, Wang S. Progress and perspectives in infection mechanism of *Ustilaginoidea virens*. *Sci Agric Sin*, 2012, 45(22): 4604-4611.
- [3] 李小娟,刘二明,肖启明,等.稻曲病研究进展.农药研究与应用,2006,10(3):9-12.
Li X J, Liu E M, Xiao Q M, et al. Advances on studies about false smut of rice. *Agrochem Res & Appl*, 2006, 10(3): 9-12.
- [4] 祭芳,曹欢,徐剑宏,等.高效液相色谱-串联质谱法定量检测稻谷中的稻曲病菌毒素 A 和 D.中国水稻科学,2012,26(2):246-250.
Ji F, Cao H, Xu J H, et al. Simultaneous quantitative determination of ustiloxin A and ustiloxin D in rice grains by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chin J Rice Sci*, 2012, 26(2): 246-250.
- [5] 尹小乐,陈志谊,刘永锋,等.稻曲毒素 A 的相对含量分析及其与致病力的相关性.中国农业科学,2012,45(22):4720-4727.
Yin X L, Chen Z Y, Liu Y F, et al. Detection of the relative content of ustiloxin A in rice false smut balls and correlation analysis between pathogenicity and ustiloxin A production of *Ustilaginoidea virens*. *Sci Agric Sin*, 2012, 45(22): 4720-4727.
- [6] 李燕,尹小乐,刘永锋,等.稻曲病菌生物学特性与致病力相关性研究.植物病理学报,2012,42(4):353-364.
Li Y, Yin X L, Liu Y F, et al. Relativity of biological characteristics and pathogenicity of *Ustilaginoidea virens*. *Acta Phytopathol Sin*, 2012, 42(4): 353-364.
- [7] 刘见平,唐涛,张松柏,等.稻曲病初侵染源及病菌侵染适期初步研究.杂交水稻,2009,24(1):74-77.
Liu J P, Tang T, Zhang S B, et al. Primary studies on initial infection sources and pathogen-infecting favorable stage for rice false smut. *Hybrid Rice*, 2009, 24(1): 74-77.
- [8] 缪巧明.稻曲病的侵染途径研究.云南农业大学学报,1992,7(1):40-42.
Miao Q M. Studies on infection route of rice false smut. *J Yunnan Agric Univ*, 1992, 7(1): 40-42.
- [9] Chen Y, Zhang Y, Yao J, et al. Frequency distribution of sensitivity of *Ustilaginoidea virens* to four EBI fungicides, prochloraz, difenoconazole, propiconazole and tebuconazole, and their efficacy in controlling rice false smut in anhui province of China. *Phytoparasitica*, 2013, 41(3): 277-284.
- [10] 汪爱娟,王国荣,孙磊,等.稻曲病防治药剂筛选及防控技术研究.中国稻米,2015,21(6):45-51.
Wang A J, Wang G R, Sun L, et al. The control technologies and fungicides screening for rice false smut *Ustilaginoidea virens*. *China Rice*, 2015, 21(6): 45-51.
- [11] 范允卿,张舒,喻大昭,等.稻曲病病原菌毒素研究进展.湖北农业科学,2012,51(21):4701-4704.
Fan Y S, Zhang S, Yu D Z, et al. Research progress on *Ustilaginoidea virens*. *Hubei Agric Sci*, 2012, 51(21): 4701-4704.
- [12] 卞英芳,于莎莎,牟仁祥,等.高效液相色谱-高分辨质谱法鉴定水稻稻曲病菌毒素.色谱,2015,33(10):1046-1050.
Bian Y F, Yu S S, Mou R X, et al. Identification of ustiloxins in false smut balls of rice based on high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Chin J Chrom*, 2015, 33(10): 1046-1050.
- [13] 张震,杜新法,柴荣耀,等.稻曲病菌 PMK1 类同源基因克隆及在稻瘟病菌遗传互补中的功能验证.微生物学报,2008,48(11):1473-1478.
Zhang Z, Du X F, Chai R Y, et al. Cloning of a homologous gene of *Magnaporthe grisea* PMK1 type MAPK from *Ustilaginoidea virens* and functional identification by complement in *Magnaporthe grisea* corresponding mutant. *Acta Microbiol Sin*, 2008, 48(11): 1473-1478.
- [14] 张震,王教瑜,杜新法,等.稻曲病菌 cDNA 文库的构建.植物病理学报,2008(5):462-467.
Zhang Z, Wang J Y, Du X F, et al. Construction of a cDNA library of the fungus *Ustilaginoidea virens*. *Acta Phytopathol Sin*, 2008(5): 462-467.
- [15] 刘连盟,王玲,黄雯雯,等.水稻稻曲病菌 G 蛋白 β 亚基基因的克隆、表达与序列分析.中国水稻科学,2010,24(4):353-359.
Liu L M, Wang L, Hunag W W, et al. Cloning, expression and sequence analysis of G protein β subunit gene of rice false smut pathogen *Ustilaginoidea virens*. *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(4): 353-359.
- [16] Chen X L, Yang J, Peng Y L. Large-scale insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Met Mol Biol*, 2011, 722: 213-224.
- [17] Masayuki N, Hideto K, Keisuke O, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for investigating pathoge-

- nicity genes of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum sansevieriae*. *Curr Microbiol*, 2012, 65(2): 176-182.
- [18] 吴小燕, 王教瑜, 张震, 等. 稻瘟病菌致病性增强突变体 B11 的基因分析. *中国水稻科学*, 2009, 23(6): 611-615.
- Wu X Y, Wang J Y, Zhang Z, et al. Analysis on gene locus of *Magnaporthe oryzae* B11, a pathogenicity-enhanced mutant. *Chin J Rice Sci*, 2009, 23(6): 611-615.
- [19] 张震, 杜新法, 柴荣耀, 等. 根癌农杆菌介导遗传转化稻曲病菌. *中国水稻科学*, 2006, 20(4): 440-442.
- Zhang Z, Du X F, Chai R Y, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the pathogen of *Ustilaginoidea virens*. *Chin J Rice Sci*, 2006, 20(4): 440-442.
- [20] 于俊杰, 聂亚锋, 俞咪娜, 等. 稻曲病菌分生孢子高产突变体 A2588 的 T-DNA 插入位点侧翼基因分析. *中国农业科学*, 2013, 46(24): 5132-5141.
- Yu J J, Nie Y F, Yu M N, et al. Characterization of T-DNA insertion flanking genes of enhanced-conidiation *Ustilaginoidea virens* mutant A2588. *Sci Agric Sin*, 2013, 46(24): 5132-5141.
- [21] 俞咪娜, 胡建坤, 黄磊, 等. 稻曲病菌 T-DNA 插入突变体 5062 的插入位点分析. *中国农业科学*, 2013, 46(9): 1790-1798.
- Yu M N, Hu J K, Huang L, et al. Molecular characterization of T-DNA integration of the *Ustilaginoidea virens* mutant 5062. *Sci Agric Sin*, 2013, 46(9): 1790-1798.
- [22] 王亚会, 刘永锋, 陆凡, 等. 稻曲病菌 T-DNA 插入突变体 B1464 插入位点分析. *中国水稻科学*, 2015, 29(3): 311-318.
- Wang Y H, Liu Y F, Lu f, et al. Molecular characterization of T-DNA integration into *Ustilaginoidea virens* mutant B1464. *Chin J Rice Sci*, 2015, 29(3): 311-318..
- [23] Mullins E D, Chen X, Romaine P, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 2008, 91(2): 173-180.
- [24] 张君成, 陈志谊, 张炳欣, 等. 稻曲病的接种技术研究. *植物病理学报*, 2004, 34(5): 463-467.
- Zhang J C, Chen Z Y, Zhang B X, et al. Inoculation techniques used for inducing rice false smut efficiently. *Cta Phytopathol Sin*, 2004, 34(5): 463-467.
- [25] 李燕, 于俊杰, 刘永锋, 等. 稻曲病菌产孢能力及致病力测定. *中国农业科学*, 2012, 45(20): 4166-4177.
- Li Y, Yu J J, Liu Y F, et al. Determination of sporulation and pathogenicity of *Ustilaginoidea virens*. *Sci Agric Sin*, 2012, 45(20): 4166-4177.
- [26] MacPherson S, Laroche M, Turcotte B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(3): 583-604.
- [27] Aron M B, Lu S, Anderson J B, et al. a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucl Acids Res*, 2011: D225-D229 .
- [28] Marchler-Bauer A, Derbyshire M K, Gonzales N R, et al. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucl Acids Res*, 2014, 43 (D1): D222-D226.
- [29] 张莉林. 294 个稻瘟病菌转录因子基因的敲除和功能分析. 杭州: 浙江大学, 2013.
- Zhang L L. Knock-out and functional analysis of 294 transcription factor genes in *Magnaporthe oryzae*. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.
- [30] Bailey L A, Ebbole D J. The fluffy gene of *Neurospora crassa* encodes a Gal4p-type C6 zinc cluster protein required for conidial development. *Genetics*, 1998, 148(4): 1813-1820.
- [31] Maruta H, Burgess A W. Regulation of the Ras signalling network. *Bioessays*, 1994, 16(7): 489-496.
- [32] Wang Y, Boguski M, Riggs M, et al. *Sar1*, a gene from *Schizosaccharomyces pombe* encoding a protein that regulates *ras1*. *Cell Reg*, 1991, 2(6): 453-465.
- [33] Bourne H R, Sanders D A, McCormick F. The GTPase superfamily: Conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 1991, 349(6305): 117-127.
- [34] Colicelli J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Science's STKE*, 2004, 2004(250): RE13.
- [35] Brodhagen M, Keller N P. Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Mol Plant Pathol*, 2006, 7(4): 285-301.
- [36] Yu J H, Keller N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Ann Rev Phytopathol*, 2005, 43(1): 437-458.