

基因枪介导小麦条锈菌毒性突变的研究^{*}

张如佳,王 阳,王美南,井金学,李振岐

(西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了得到带有明确遗传标记的毒性突变菌株,应用基因枪转化技术,以小麦条锈菌野生白化菌系为转化受体,以含有潮霉素抗性基因(*Hyg*)的质粒为插入载体,对基因枪介导小麦条锈菌插入突变的条件进行了研究。结果表明,当小麦条锈菌夏孢子萌动 2 h,可裂膜承载压力为 1 100 Psi 时进行轰击转化,所得的小麦条锈菌夏孢子在含有潮霉素的培养基上萌发率最高,为 36.09%。进一步将转化的小麦条锈菌夏孢子进行扩繁,在筛选品种上筛选,将筛选到的突变体在其上继代培养 4 代,获得了两个稳定的毒性突变菌株 M_{M-2} 、 M_{M-3} 。 M_{M-2} 菌株对南大 2419 的毒性减弱,反应型由野生菌系的 4 型变为 2 型; M_{M-3} 菌株在南大 2419 的反应型由野生菌系的 4 型变为 2、3 型,毒性发生分化。采用中国鉴别寄主对突变体的毒性研究表明,各突变菌株的毒性均较原始菌系发生了明显改变。进一步用 *Hyg* 基因特异 PCR 在两个突变菌系中均扩增到目的片段,表明 M_{M-2} 、 M_{M-3} 的突变是由 *Hyg* 基因插入引起的。

[关键词] 小麦条锈菌; 基因枪; 毒性变异; 插入突变

[中图分类号] S435.121.4⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0087-05

Mutations induced by biolistics affecting virulence in *Puccinia striiformis*

ZHANG Ru-jia, WANG Yang, WANG Mei-nan, JING Jin-xue, LI Zhen-qi

(College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to obtain the virulence with genetic tag, insertional mutagenesis was made in *Puccinia striiformis* by using biolistics with the wild virulent albino strains of *P. striiformis* as transformation acceptors and the plasmids with gene conferring resistance to hygromycin B as vectors. Result showed germination rate of transformed urediospores on media containing hygromycin B reached the highest rate of 36.09% when the transformation was hydrated 2 hours before bombardment of albino strain urediospores and under the delivery pressure of 1 100 Psi. The transformants were further propagated and stably selected on screen cultivars for four generations, through which we obtained two virulence mutants of strains. Virulence of M_{M-2} isolate generated by non-virulence mutation on Mentana host was reduced, and transformed to reaction type 2, different from the original reaction type 4; M_{M-3} isolate transformed to type 2 and 3 on Mentana host, from its original race Type 4, which was indicative of virulence differentiation. The virulence spectrum of mutants on China differential hosts indicated that significant virulence changes had occurred in each mutant in comparison with original races. Fragments of interest were also obtained by PCR amplification of two virulence mutants of strains, which showed M_{M-2} and M_{M-3} were mutated by *Hyg* gene.

Key words: *Puccinia striiformis*; biolistics; pathogenicity variation; insertion mutation

^{*} [收稿日期] 2006-12-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30370921);西北农林科技大学青年基金项目(04ZM088);教育部和西北农林科技大学创新团队支持项目

[作者简介] 张如佳(1981-),女,重庆巴南区人,硕士,主要从事植物病理学研究。E-mail:rujiazhang@hotmail.com

[通讯作者] 王 阳(1973-),女,上海崇明人,讲师,在读博士,主要从事植物免疫研究。E-mail:wangyang@cnipm.com

小麦条锈病是由小麦条锈菌 (*Puccinia striiform* West. f. sp. *tritici*) 引起的气流传播性病害, 遍及世界各主要麦区, 也是我国小麦最重要的病害和主要监控研究对象。国内外研究和生产实践证明, 种植抗锈良种是综合控制小麦条锈病最经济、有效、易行和对环境安全的核心措施。但是小麦条锈菌毒性变异频繁, 可以通过变异产生新的毒性小种, 导致小麦品种抗病基因失效, 引起小麦条锈病周期性流行危害。因此, 阐明小麦条锈菌毒性变异的原因和规律, 提出有效对策, 以延长小麦品种使用寿命, 是小麦条锈病防治和小麦育种中亟需解决的关键问题^[1]。

病原菌毒性变异的机制有有性重组、突变、异核作用和适应性变异等多种途径, 其中突变尤为重要^[2-5]。病原菌突变体库的构建是进行分子遗传分析的重要手段, 也是克隆致病相关基因的捷径。人工突变研究的主要方法有物理诱变、化学诱变和插入突变等。小麦条锈菌是高度专性寄生菌, 迄今未发现其有性时期, 不能在人工培养基上生长, 因此其毒性突变研究的难度和工作量更大。到目前为止, 已经研究了 X 射线、紫外线和化学诱变剂 EMS 对小麦条锈菌的突变效应, 并获得了规律性的研究成果^[6-10]。但是由于小麦条锈菌不能进行有性杂交, 通过这些方法获得的突变体难以找到明确的分子遗传标记, 进一步克隆致病基因时困难较大。近年来研究发现, 插入诱变在基因克隆中具有明显的优势。插入诱变是将一个带有显性标记的外源片段插入到受体基因组中, 改变基因的表达, 从而筛选到所需的突变体。对于通过插入突变方法获得的突变体, 可通过质粒拯救, 筛选基因组文库或 PCR 等方法获得侧翼基因组序列, 克隆变异基因。

插入突变研究的前提是将外源 DNA 送入受体细胞, 并整合到受体基因组中。常用的转化方法有基因枪轰击、电击或化学融合、农杆菌转染、病毒转染等。由于小麦条锈菌难以在培养基上人工培养, 且不易获得大量的供转化用的原生质体, 因此采用基因枪转化是比较现实的途径。用基因枪转化小麦秆锈菌和小麦叶锈菌已有报道^[11-12]。本课题组已运用基因枪转化小麦条锈菌, 使外源 *GUS* 基因在小麦条锈菌夏孢子及芽管中得到瞬时表达^[13]。

本试验在前期研究工作的基础上, 应用基因枪转化技术研究了小麦条锈菌的毒性突变规律, 为进一步克隆小麦条锈菌致病基因和无毒基因创建材料。

1 材料和方法

1.1 材料

供试菌种: 供试野生菌系选用西北农林科技大学植物抗病遗传研究室保存的小麦条锈菌白化菌系, 建立单孢子纯系, 并经鉴别寄主确定。

小麦品种: 以辉县红为病菌繁殖品种; 以中国鉴别寄主为毒性突变体的筛选和鉴别寄主。各品种均为纯系。

1.2 质粒

质粒为 p KL Hyg14 (带潮霉素抗性基因 *Hyg*), 来自德国亚琛生物学研究所 I (植物学/分子遗传学) [Institut für Biologie I (Botanik/ Molekulare Genetik), Aachen, Germany]。利用优晶公司提供的试剂盒提取纯化 p KL Hyg14 质粒 DNA。提取结束后, 用 *EcoR* I 对 p KL Hyg14 质粒 DNA 进行酶切, 经琼脂糖凝胶电泳检测确认后, 保存于 -20℃ 冰箱。

1.3 基因枪转化前受体材料的处理

将新鲜收集的小麦条锈菌夏孢子配成 4 mg/mL 的菌液 (可加入 0.01% 吐温 80), 吸取 30 μL 菌液轻轻涂抹在 1% ~ 2% 琼脂糖培养基中部, 在 4℃ 冰箱分别萌动 0.5, 1, 1.5, 2 h, 准备进行基因枪轰击。

1.4 受体材料的轰击转化

采用 PDS21000/He 基因枪 (Bio-Rad)。取金粉悬浮液 (6 mg 金粉用无水乙醇消毒, 悬浮于 100 μL 50% 甘油中) 10 μL, 加入 20 μL 质粒 DNA, 50 μL 2.5 mol/L CaCl₂, 20 μL 0.1 mol/L 亚精胺, 充分混匀, 离心, 用无水乙醇沉淀, 重新悬浮于 60 μL 无水乙醇中, 均匀滴加在 6 片轰击膜上, 按照该基因枪手册所述程序对靶材料进行轰击。轰击参数为: 可裂膜与承载膜之间的距离 2.5 cm, 承载膜与阻挡网之间的距离 0.8 cm, 阻挡网与靶细胞之间的距离 6 cm, 氦气压力 27 kPa, 金粉颗粒直径 0.6 μm, 可裂膜承载压力分别为 650, 900 和 1 100 Psi。对照采用相同的处理方法, 但在基因枪轰击时不用可裂膜。

1.5 潮霉素抗性基因的瞬时表达

p KL Hyg14 转化小麦条锈菌后, 将条锈菌从普通琼脂糖培养基上转移到含 50 μg/mL 潮霉素的琼脂糖培养基上, 放到 4℃ 冰箱中, 8 ~ 10 h 后在普通显微镜下观察小麦条锈菌夏孢子的萌发率及抗潮霉素基因的表达。

1.6 突变菌株的筛选鉴定

选取长势均匀一致的一叶期辉县红幼苗, 将经基因枪轰击后的小麦条锈菌夏孢子迅速溶于 50

μg/mL 潮霉素溶液中,制成孢子悬浮液涂抹接种小麦叶片,黑暗条件下保湿 24 h 后移入 14~16 ℃ 温室中隔离培养。培养条件为:每天光暗时间分别为 16 h/8 h,光照强度为 8 000~10 000 lx,相对湿度为 60%~80%。发病后分叶片收取小麦条锈菌夏孢子,进行分子检测。将检测到目的片段的菌种接种筛选品种,并在同样条件下培养。发病后对照野生菌系的反应型,筛选出与野生菌系有明显致病性差异的菌株(包括毒性突变和无毒性突变),在辉县红上扩繁,然后转接到对应的筛选品种上确认,将连续 4 代表现稳定的突变菌株接种小麦条锈菌鉴别寄主进行毒性鉴定。为了防止菌系的交叉污染,整个试验在隔离条件下进行。

1.7 小麦条锈菌插入突变体的分子检测

以潮霉素抗性基因 *Hyg* 的核苷酸序列为基础设计特异引物,对连续培养 4 代后毒性稳定的小麦条锈菌突变菌系,进行潮霉素抗性基因 *Hyg* 的特异 PCR 检测,以确定毒性的突变是否是由于外源核苷酸序列的插入所致。

小麦条锈菌基因组 DNA 的提取:采用 CTAB/SDS 法,参照 Chen 等^[14]的方法并稍作改进。

潮霉素抗性基因 *Hyg* 的 PCR 检测:依据基因 *Hyg* 序列分别设计上、下游特异性引物 *hphF* (5'-GA GCCTGACCTA TTGCA TCTC-3') 和引物 *hphR*

(5'-CCGTCAACCAA GCTCTGATA G-3'),引物由上海生物工程公司合成。扩增反应体系为 25 μL,其中含 10 × 反应缓冲液 2.5 μL, MgCl₂ (2.5 mmol/L) 2.5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μL, *Taq* 酶 (5 U/μL) 0.25 μL (以上试剂均为 MBI Fermentas 公司产品),模板 DNA (20 ng/μL) 40 ng,引物 *hphF*, *hphR* 各 2.0 μL (10 μmol/L), ddH₂O 11.75 μL。扩增反应在 MJR 系列扩增仪(东胜创新公司)上进行。反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 45 s, 63 ℃ 复变性 1 min, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 20 min。反应结束后,取 5 μL 扩增产物经加有溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, DNA 分子量 Marker 为东盛公司的 DL2000 (2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp),用凝胶成像分析系统(英国 Gene Genius 公司)记录 DNA 谱型并照相。

2 结果与分析

2.1 轰击后小麦条锈菌夏孢子在潮霉素培养基上的萌发率

由表 1 可见,当萌动 2 h,在可裂膜承载压力分别为 650, 900, 1 100 Psi 时,转化后的小麦条锈菌夏孢子萌发率均有显著提高,可裂膜承载压力为 1 100 Psi 时萌发率最高,为 36.09%。

表 1 pKL Hyg14 转化后小麦条锈菌白化菌系的萌发率

Table 1 Germination rate of urediospores of *P. striiformis* after the transformation of pKL Hyg14 %

可裂膜承载压力/ Psi Delivery pressures	萌动时间/ h Germination time			
	0.5	1	1.5	2
650	5.70	7.69	10.63	17.71
900	0	2.27	15.70	21.13
1 100	0	5.37	25.77	36.09
灭菌水(CK) Sterilized water	1.34	11.66	27.57	14.66

2.2 小麦条锈菌突变菌株的筛选

小麦条锈菌野生菌株白化-5 在筛选品种南大 2419 上的反应型为 4,在阿勃、尤皮 号和丰产 3 号上的反应型为 3。经可裂膜承载压力为 1 100 Psi 轰击处理后,小麦条锈菌白化-5 夏孢子在这几个品种

上培养,筛选出 7 个毒性变异的菌株,其中 3 个来自南大 2419 (4 1, 2, 3),其余 4 个分别来自阿勃(3 0;)、尤皮 号(3 0, 0;)、丰产 3 号(3 0)。这些菌株均为毒性降低的突变体,经过进一步筛选获得了 2 个突变体单孢子堆分离系(表 2,图 1)。

表 2 小麦条锈菌突变菌株在筛选品种上的反应型

Table 2 Infection type of stripe rust mutants on screen cultivars

突变菌株 Mutants	筛选品种 Screen cultivars	反应型 Infection types	突变菌株 Mutants	筛选品种 Screen cultivars	反应型 Infection types
M _M -1	南大 2419 Mentana	1	M _J -1	尤皮 号 Jubilejina	0
M _M -2	南大 2419 Mentana	2	M _J -2	尤皮 号 Jubilejina	0;
M _M -3	南大 2419 Mentana	3	M _F -1	丰产 3 号 Fengchan 3	0
M _A -1	阿勃 Abbondanza	0;			

注: M 代表 mutant,即突变菌株,下标分别代表品种代号和突变体的编号。

Note: M means virulent mutants, and subscript means the first alphabet of cultivars' names and the code of mutants, respectively.

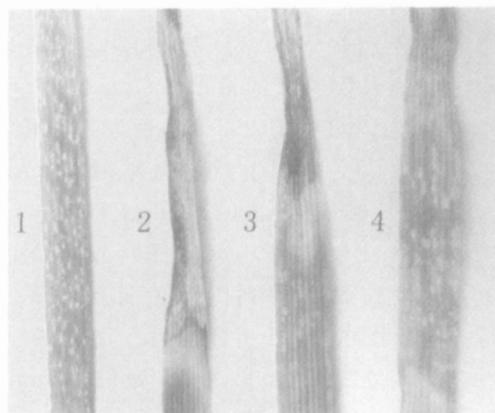


图 1 原始菌株和经 1 100 Psi 处理后的菌株在南大 2419 上的反应型

- 1. 原始菌株的反应型为 4 型; 2. 处理后菌株的反应型为 1 型;
- 3. 处理后菌株的反应型为 2 型; 4. 处理后菌株的反应型为 3 型

Fig. 1 Phenotypes of original race and Albino-5 by 1 100 Psi on seedling leaves of Mentana

- 1. Original race infection type (IT) "4"; 2. Bombed race IT "1";
- 3. Bombed race IT "2"; 4. Bombed race IT "3"

在筛选品种上挑取单孢子堆分离过程中,由于 0,0;型没有孢子,而 1 型孢子堆不破裂,所以都未得到突变体菌株进行进一步突变菌系的鉴定。

2.3 小麦条锈菌突变菌系的毒性谱

以白化菌系的 2 个突变菌株分别接种中国鉴别寄主,对各突变菌株的毒性进行鉴定。结果表明,各突变菌株的毒性均较原始菌系发生了明显改变(表 3)。M_{M-2}、M_{M-3} 菌株是白化菌系经可裂膜承载压力为 1 100 Psi 轰击处理后在南大 2419 上筛选出来的。由表 3 可知,野生菌株白化-5 在南大 2419 上的反应型是 4,而突变菌株 M_{M-2} 表现为 2 型反应,M_{M-3} 表现为 2,3 型毒性分化。与野生菌株白化-5 相比,M_{M-2}、M_{M-3} 菌株对丰产 3 号的毒性增强,使该寄主的反应由中感变为高感;而 M_{M-2} 菌株对阿勃的毒性明显降低,在该寄主的反应由感病变为近免疫;M_{M-3} 菌株对其他鉴别寄主的毒性均未发生变化。

表 3 小麦条锈菌突变菌系在中国鉴别寄主上的反应型

Table 3 Infection type of stripe rust mutants on Chinese wheat differential cultivars

鉴别寄主 Differential cultivars	野生菌株 Wild type	突变菌株 Insertion mutants		鉴别寄主 Differential cultivars	野生菌株 Wild type	突变菌株 Insertion mutants	
	白化-5 Stripe rust Abino-5	M _{M-2}	M _{M-3}		白化-5 Stripe rust Abino-5	M _{M-2}	M _{M-3}
Trigo Eureka	0;	0;	0;	尤皮 号 Jubilejina	3	3	3
Fulhard	4	4	4	丰产 3 号 Fengchan 3	3	4	4
保春 128 Lutescens 128	4	4	4	洛夫林 13 Lovrin 13	0;	0;	0;
南大 2419 Mentana	4	2	2,3	抗引 655 Kangyin 65	0;	0;	0;
维尔 Virgilio	0;	0;	0;	水源 11 Suwon 11	0;	0;	0;
阿勃 Abbondanza	3	0;	3	中四 Zhong 4	0;	0;	0;
早洋 Early Premium	0;	0;	0;	洛夫林 10 Lovrin 10	0;	0;	0;
阿夫 Funo	0;	0;	0;	杂 46 Hybrid 46	0;	0;	0;
丹麦 1 号 Danish 1	0;	0;	0;	铭贤 169 (CK) Mingxian169	4	4	4

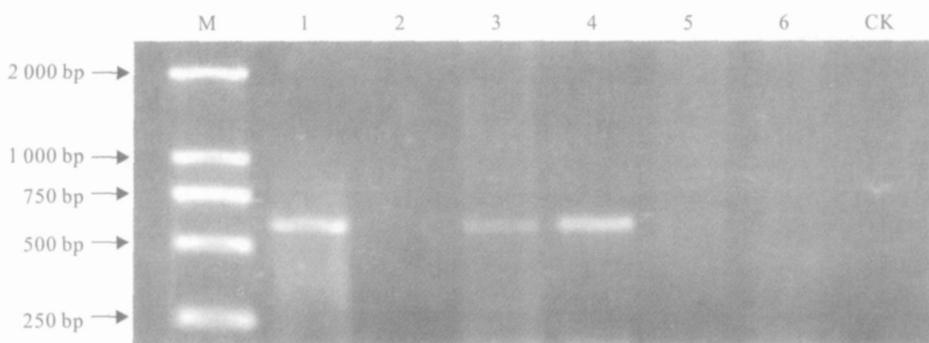


图 2 小麦条锈菌轰击后代 PCR 扩增产物的电泳图谱

- M. DNA 标样; 1. 质粒 p KL Hyg14; 2. 野生菌株白化-5; 3. M_{M-2}; 4. M_{M-3}; 5. 经 650 Psi 处理后的菌系; 6. 经 900 Psi 处理后的菌系; CK. 清水

Fig. 2 Electrophoresis of PCR amplicons from Albino genomic DNA by bombardment

- M. DNA marker; 1. Plasmid p KL Hyg14; 2. Albino-5; 3. M_{M-2}; 4. M_{M-3}; 5. White isolate of wheat stripe rust-5 by 650 Psi;
- 6. White isolate of wheat stripe rust-5 by 900 Psi; CK. H₂O

2.4 小麦条锈菌突变菌株的特异 PCR 检测

由图 2 可以看出,利用根据潮霉素抗性基因 (*Hyg*) 序列设计的引物,在质粒阳性对照 (p KL Hyg14),以及经可裂膜承载压力为 1 100 Psi 轰击后得到的小麦条锈菌突变菌株 M_{M-2} 、 M_{M-3} 的后代夏孢子 DNA 中,扩增出了约 588 bp 的特异性片段,而在未转化的小麦条锈菌夏孢子,以及经可裂膜承载压力为 650,900 Psi 轰击后的小麦条锈菌夏孢子 DNA 中未扩增出目的片段,表明小麦条锈菌突变菌株 M_{M-2} 、 M_{M-3} 夏孢子中有 *Hyg* 基因序列的插入。

3 讨 论

影响基因枪转化效率的因素很多。本研究结果表明,可裂膜与承载膜之间的距离为 2.5 cm,承载膜与阻挡网之间的距离为 0.8 cm,阻挡网与靶细胞之间的距离为 6 cm,氦气压力 27 kPa,金粉颗粒直径为 0.6 μm ,可裂膜承载压力为 1 100 Psi 时,转化率较高,且在此压力下轰击的菌种接种繁殖的后代,经 PCR 检测到目的片断。此外,转化前小麦条锈菌萌动时间对转化效率也有一定影响,本研究选择合适萌动时间为 2 h。

小麦条锈菌毒性突变研究,是揭示其毒性遗传变异规律的基础工作,由于小麦条锈菌生物学特性增加的研究难度限制了其研究进展,国外已报道的仅有几例,且均为紫外线诱变^[8]。在国内,商鸿生等^[10]用紫外线诱变技术对小麦条锈菌的一个优势小种进行了系统研究,获得了 7 个突变菌系;姚秋燕等^[9]用 EMS 对我国小麦条锈菌 CY17 和 CY31 两个生理小种进行诱变处理后获得 5 个突变菌系,这些研究为基因突变是我国小麦条锈菌毒性变异途径提供了试验证据。但是通过这些方法获得的突变体由于缺乏明确的遗传标记,对变异基因进行进一步的研究困难较大。本试验运用基因枪对小麦条锈菌白化菌系进行轰击转化后,获得 2 个非毒性突变菌株 M_{M-2} 和 M_{M-3} ,这两个突变菌株带有显性标记,使进一步克隆变异基因,研究其结构和功能成为可能。

突变菌株毒性较稳定,经连续 4 代繁殖后 M_{M-2} 在南大 2419 上表现稳定,毒性未发生变异;而 M_{M-3} 在南大 2419 上毒性发生了分化,但未发生回复突变,在后续的工作中还需进一步进行分离纯化。

突变是遗传物质的变化通过表现型的改变而被识别。在研究突变时必须要有清晰且易于识别的遗传标记检出突变体。一般用于锈菌突变研究的主要标记有毒性标记^[9]。本研究中质粒 p KL Hyg14 含有潮霉素抗性基因,当这个基因表达时宿主会对潮霉素产生抗性。轰击转化后的小麦条锈菌夏孢子,经一段时间后潮霉素基因在其中表达,潮霉素为筛选突变体提供了一个更优的途径。

[参考文献]

- [1] 李振岐. 我国小麦品种抗条锈性丧失原因及其解决途径[J]. 中国农业科学, 1980(3): 72-76.
- [2] 康振生, 李振岐, 商鸿生. 小麦条锈菌夏孢子阶段核相状况的研究[J]. 植物病理学报, 1994, 24(1): 26-31.
- [3] 马青, 康振生, 李振岐. 小麦条锈菌夏孢子芽管在小麦叶片上结合现象的研究[J]. 西北农业大学学报, 1993, 21(2): 97-99.
- [4] 李振岐, 陆和平, 马青. 小麦条锈菌夏孢子芽管染色方法改进研究[J]. 西北农业大学学报, 1985, 13(1): 1-13.
- [5] Webster R K. Recent advances in the genetics of plant pathogenic fungi[J]. Ann Rev Phytopathology, 1974, 12: 331-353.
- [6] Griffiths D J, Carr J H. Induced mutation for pathogenicity in *Puccinia coronata avenae* [J]. Trans Br Mycol, 1961, 44: 601-607.
- [7] Jonson R, Priestley T H, Taylor E C. Occurrence of virulence in *Puccinia striiformis* for compare wheat in England[J]. Cereal Rusts Bull, 1978, 6: 11-13.
- [8] Luig N H. A high reversion rate for yellow urediospore color in *Puccinia graminis* f. sp. tritici [J]. Phytopathology, 1967, 57: 1091-1093.
- [9] 姚秋燕, 王国芬, 徐智斌, 等. EMS 诱导小麦条锈菌毒性突变的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(6): 120-123.
- [10] 商鸿生, 井金学, 李振岐. 紫外线诱导小麦条锈菌毒性突变的研究[J]. 植物病理学报, 1994, 24(4): 347-351.
- [11] Schillberg S, Tiburzy R, Fischer R. Transient transformation of the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. tritici [J]. Mol Genet, 2000, 26(2): 911-915.
- [12] Craig A W, Les J S, Guus B, et al. Transient expression and insertional mutagenesis of *Puccinia triticina* using biolistics [J]. Functional & Integrative Genomics, 2005, 12: 1-11.
- [13] 王阳, 王美南, 张如佳, 等. 基因枪法转化基因在小麦条锈菌中的瞬时表达[J]. 西北植物学报, 2006, 26(6): 1115-1118.
- [14] Chen X M, Line R F, Leung H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis* [J]. Phytopathology, 1993, 83: 1489-1497.