



利用绿色荧光蛋白研究大豆疫霉与大豆的互作

陈孝仁, 程保平, 王新乐, 董莎萌, 王永林, 郑小波, 王源超*

南京农业大学植物病理系, 南京 210095

* 联系人, E-mail: wangyc@njau.edu.cn

2009-04-02 收稿, 2009-04-22 接受

国家自然科学基金(批准号: 30671345)和江苏省自然科学基金(批准号: BK2007161)资助项目

摘要 利用卵菌 *Bremia lactucae* 的 *hsp70* 启动子和 *ham34* 终止子序列, 将外源绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因转化进大豆疫霉。利用荧光显微镜观察了 *gfp* 基因在大豆疫霉不同发育阶段的表达。另外, 利用该报告基因系统观察了大豆疫霉在寄主大豆叶片、下胚轴和根部的侵染行为以及显微分析了不同抗性的大豆品种抗大豆疫病在根部的差异。结果表明, *gfp* 基因能够在大豆疫霉中稳定表达, 在菌丝、游动孢子囊、游动孢子、休止孢、卵孢子阶段都能够观察到绿色荧光; 以 GFP 作为标记可以实时地观察到大豆疫霉在寄主体内的侵染过程, 发现大豆疫霉在抗性大豆品种根部表面萌发的芽管明显长于在感病品种根部萌发的芽管长度。结果表明, GFP 可以作为大豆疫霉遗传研究中有价值的分子标记。

关键词

大豆疫霉

大豆

绿色荧光蛋白

遗传转化

抗病性

卵菌疫霉属的许多物种都能够侵染多种植物, 引起的毁灭性病害每年可造成几十亿美元的损失^[1,2]。虽然卵菌的生长形态类似真菌, 但在亲缘关系上更靠近褐藻和硅藻, 从而形成一个独特的真核微生物类群-茸鞭生物界或假菌界(Stramenopiles)^[3]。由于卵菌具有二倍体营养生长特性以及缺少高效的分子遗传操作技术, 一直以来, 在分子水平上对卵菌的研究进展相对缓慢^[4,5]。

大豆疫霉 *Phytophthora sojae* (Kaufmann and Gerdemann) 是一种极为重要的植物病原卵菌, 它的发生促使大豆 (*Glycine max* L. (Merr)) 幼苗的猝倒和成株大豆的根腐, 这种大豆疫病是大豆生产上的毁灭性病害之一, 每年给全球的大豆生产造成 10~20 亿美元的损失^[6]。

与致病相关的大豆疫霉发育过程包括: 游动孢子的产生与萌发、芽管的伸长、与寄主植物接触后形成附着胞等侵染结构、侵入寄主后短暂的活体营养阶段和随后的死体营养阶段^[7]。到现在为止, 对大豆疫霉侵染植物过程的研究主要是利用光学显微镜和电

子显微镜进行观察^[8~10]。Ward 等人^[8]利用光学显微镜和电子显微镜观察了大豆 Harosoy63 在分别接种大豆疫霉 1 号生理小种(不亲和)和 4 号生理小种(亲和)游动孢子 2, 3, 5 及 7 h 后的互作反应, 发现不同生理小种的大豆疫霉在大豆 Harosoy63 上的定殖率没有显著差异, 但在引起大豆细胞死亡反应上存在显著差异。Enkerli 等人^[9]同样利用光学显微镜和电子显微镜观察了抗、感大豆疫病的大豆品种接种大豆疫霉后 0.5~20 h 之间的互作反应, 结果发现在这两个互作类型中, 游动孢子的休止、萌发以及随后侵染寄主这一系列过程都发生在接种后 30 min 内, 并且没有发现附着胞的形成; 接种 4 h 后, 不亲和反应中没有观察到大豆疫霉吸器的形成, 但发现寄主细胞迅速坏死, 并且形成细胞壁沉积物, 而在亲和反应中则观察到大豆疫霉吸器的形成, 没有触发明显的寄主皮层细胞坏死反应。左豫虎等人^[10]同样用光学显微镜和电子显微镜研究了 2 个大豆品种与大豆疫霉的亲亲和性和非亲和性互作, 观察结果与 Enkerli 等人^[9]的报道类似。

引用格式: 陈孝仁, 程保平, 王新乐, 等. 利用绿色荧光蛋白研究大豆疫霉与大豆的互作. 科学通报, 2009, 54: 1894~1901

Chen X R, Cheng B P, Wang X L, et al. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker for studying the interaction of *Phytophthora sojae* and soybean. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0417-7

Judelson 等人^[11]首先在致病疫霉(*Phytophthora infestans*)中建立起CaCl₂-polyethyleneglycol (PEG)介导的原生质体转化系统,这是卵菌分子生物学研究上的一个重大进展.利用这个转化方法,目前已经成功将 β -glucuronidase基因(*gus*)转入*P. infestans*^[12,13]以及将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein)基因(*gfp*)转入*Phytophthora palmivora*^[14]、*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*^[15,16]和*Phytophthora brassicae*^[17]中进行表达,为研究疫霉的发育、基因表达以及监测病原菌在寄主体内的侵染动态提供了良好的报告基因系统^[12-15,17,18].利用*gus*基因, van West等人^[18]研究了致病疫霉活体侵染诱导基因*ipiO*的启动子活性, Judelson^[19]研究了致病疫霉卵孢子的形成, Kamoun等人^[13]监测了致病疫霉在马铃薯上的致病进程. van West等人^[14]研究了GFP在*P. palmivora*几个发育阶段上的表达, Si-Ammour等人^[17]利用GFP衡量了不同寄主对疫霉的抗性差异.衡量植物抗病性一般依据植物病斑大小或植物体上孢子形成情况,这些方法一般都需要较长时间而且判断时主观因素较多^[17]. Wubben等人^[20]将报告基因*gus*转入*Cladosporium fulvum*中表达,在显微水平观察了病原菌的侵染过程,并通过分光光度法测定了GUS活性,以此检测到寄主体内病原菌的生物量.

本研究首次将 GFP 标记转入大豆疫霉进行表达,观察了大豆疫霉在大豆上的侵染动态,并利用此报告系统显微观察了在抗病和感病大豆品种根部大豆疫霉游动孢子的侵染情况,从细胞水平上了解了大豆的抗病机制.该报告系统的建立,为大豆疫霉的分子遗传学研究提供了有价值的分子标记.

1 材料和方法

(i) 供试菌株和大豆品种.大豆疫霉全基因组测序菌株P6497系Brett M Tyler教授(Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA 24061, USA)馈赠,由南京农业大学植病系真菌实验室保存.采用 10% V8 固体培养基(10% Campbell's V8 汁, 0.02% CaCO₃, 1.5% Bacto-agar)培养菌株.为获得大豆疫霉的游动孢子囊和游动孢子,将切取的菌丝块置于 20 mL 10% V8 培养液中,于 25°C 黑暗静置培养 3 d;然后用镊子小心夹取菌丝丛,置于一个 9 cm 无菌培养皿中,加入 20 mL 无菌自来水,使其展开,于 25°C 黑暗静置 12 h;然后倒去无菌自来水,再加入 15 mL 无菌自来水,25°C 黑暗再静置 15 h后,于

光学显微镜下检查游动孢子囊形成情况.将形成游动孢子囊的菌丝丛置于 4°C 半小时,再置于室温半小时,刺激游动孢子的释放.卵孢子悬浮液制备方法^[21].大豆疫霉在利马豆固体培养基(Lima bean agar, LBA)(利马豆粉 60 g加水 1000 mL, 60°C水浴 1 h, 双层纱布过滤去渣,上清液补足 1000 mL,加入琼脂条 20 g,煮沸后持续沸腾数分钟.在 121°C高压灭菌 20 min)上培养 30 d,切取靠近接种点附近的菌丝块,置于无菌水中制成卵孢子悬浮液.

大豆品种合丰 35 和威廉姆斯(Williams)对 P6497 的侵染表现为感病,南农 8848 和威廉姆斯 82 (Williams 82)对其侵染表现为抗病.合丰 35 和南农 8848 为同一大豆遗传品系,由国家大豆改良中心(江苏省南京市)惠赠;大豆品种威廉姆斯和威廉姆斯 82 来自另外一套大豆遗传品系,由 Brett M Tyler 教授惠赠.将大豆播种在盛有无菌蛭石的塑料杯中,每杯一粒,置于温室培育(自然光照, 22~28°C),生长 10 d 后待用.

(ii) 大豆疫霉转化载体.质粒 pTH210^[11]由 Howard S Judelson 教授(University of California, Riverside, CA92521, USA)馈赠.由 Brett M Tyler 教授馈赠的转化对照质粒 pHSPN,是抗遗传霉素 geneticin (G418)的新霉素磷酸转移酶(neomycin phosphotransferase gene, *npt II*)基因取代载体 pTH210 中潮霉素磷酸转移酶(hygromycin B phosphotransferase gene, *hpt*)基因而来.

绿色荧光蛋白基因 *gfp* 序列来自载体 pACGFP1 (ClonTech Laboratories, Inc, CA 94043, USA).设计一对 PCR 引物扩增该片段,上游引物序列为 5'-ATG GTG AGC AAG GGC GCC G-3',下游引物序列为 5'-TCA CTT GTA CAG CTC ATC CAT G-3'.利用试剂盒 DR005A (大连宝生物公司),以载体 pACGFP1 为模板进行高保真 PCR 扩增,反应程序为:94°C 预变性 5 min; 95°C, 15 s, 52°C, 30 s, 72°C, 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 5 min.扩增的平末端 PCR 产物用 Wizard DNA Clear-Up System (Promega, Madison, USA)切胶回收,片段插入经 *Sma* I 酶切的 pTH210 骨架,筛选得到 *gfp* 基因可读框正向插入的载体,命名为 p210ACGFP,并测序.

利用 Endofree Plasmid Maxi Kit10 (Qiagen, CA 91355, USA)提取无内源毒素、高纯度的转化对照质粒 pHSPN 和目的质粒 p210ACGFP 的 DNA.

(iii) 大豆疫霉的转化. 大豆疫霉P6497 的转化采用CaCl₂-PEG介导的原生质体转化方法^[22]. 25 μg目的质粒p210ACGFP和 5~10 μg对照质粒pHSPN共转化 1 mL P6497 的原生质体(2×10^6 个原生质体/mL). 仅转化 10 μg对照质粒pHSPN的转化子为实验对照. 获得的所有转化子在含有 50 μg/mL遗传霉素G418 (Sangon, 上海)的选择性LBA培养基上培养.

(iv) GFP转化子的筛选确认和表达观察. 所有经共转化得到的转化子均用Leica DC300F荧光显微镜(Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) (激发光波长为 474/40 nm, 发射光波长为 505/40 nm)进行检测, 确定转化子在受蓝光激发后是否发射绿色荧光. 将能够表达绿色荧光蛋白的转化子进行单游动孢子分离^[21], 获得的单游动孢子菌株于选择性LBA培养基(含 50 μg/mL G418)上培养, 并在荧光显微镜下检测能否发射绿色荧光.

含 *gfp* 的转化子单孢株的菌丝、游动孢子囊、游动孢子、休止孢和卵孢子均在荧光显微镜下经受荧光检测, 并用 Leica DC100DC350F 数码相机拍照. 以野生型菌株 P6497 作为对照.

(v) 菌株生物学测定. 生物学测定前, 所有转化子单孢株从选择性 LBA 培养基上转移到非选择性的 LBA 培养基上生长 4 d, 再转移到新的非选择性的 LBA 培养基上生长 4 d, 去除遗传霉素的影响. 同样, P6497 和转化对照子也经两次非选择性的 LBA 培养基培养.

参照Laviolette和Athrow^[23]的下胚轴创伤法进行接种. 在菌落边缘切取 1 mm×3 mm的菌丝条作为接种体. 取苗龄 10 d的大豆合丰 35, 用解剖刀在大豆子叶下 1 cm处向下划约 0.5 cm长的伤口, 然后将接种体塞入伤口内. 接种后在 25℃条件下保湿 24 h, 然后转入温室培养. 接种P6497 和对照转化子作为对照. 每个菌株接种 10 株大豆. 接种 48 h后调查发病情况, 并用直尺测量沿接种点向大豆植株上部延伸的病斑长度, 作为评价该接种菌株致病力大小的依据^[24].

对转 *gfp* 基因单游孢菌株、转化对照以及野生型菌株的菌落形态(形状和颜色)、生长速率、孢子囊和卵孢子产量进行比较.

生长速率的测定按照Kaufmann和Gerdemann^[25]的方法进行. 实验重复 3 次.

参照Rutherford等人^[26]的方法测定孢子囊产量. 转*gfp*基因单游孢菌株、转化对照和野生型菌株分别

置于含有 15 mL LBA的平板(直径 9 cm)上, 于 25℃黑暗条件下培养 7 d, 从菌落边缘连同LBA一起切取 10 块菌丝块(10 mm×10 mm), 置于含有 30 mL无菌水的培养皿(直径 9 cm)中, 按照Bumbieris^[27]的方法诱导使其产生孢子囊, 并于显微镜下 150×视野对每一个菌丝块上产生的孢子囊进行计数. 实验重复 3 次.

参照Bhat和Schmitthenner^[28,29]的方法测定卵孢子产量. 转*gfp*基因单游孢菌株、转化对照和野生型菌株分别置于含有 15 mL LBA的平板(直径 9 cm)上, 于 25℃黑暗条件下培养 30 d, 从平板中部连同培养基一起切取 10 块菌丝块(40 mm×40 mm), 置于含有 20 mL 无菌水的烧杯中制成卵孢子悬浮液, 吸取 5 μL于显微镜下计数. 实验重复 3 次.

(vi) 转 GFP 菌株侵染大豆叶片、下胚轴、幼根的观察. 诱导 *gfp* 转化子的单孢株和 P6497 产生游动孢子, 接种株龄 10 d 的大豆植株. 剪取大豆合丰 35 叶片, 正面朝上置于平铺于灭菌培养皿底部的湿润灭菌滤纸上. 取含有 0.1%吐温-20 的单孢株游动孢子悬浮液(5×10^4 个孢子/mL) 20 μL(1000 个游动孢子)滴于叶片上, 用 Parafilm 膜封好培养皿保湿, 25℃下孵育. 同时时间点剪取的叶片滴加 20 μL 的 P6497 游动孢子悬浮液(5×10^4 个孢子/mL)(含 0.1%吐温-20)作为实验对照. 接种大豆叶片 24 h 后进行叶片酒精脱色, 然后在光谱激光扫描共聚焦显微镜 Leica TCS SP2 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)下观察叶片中含 GFP 转化子的侵染情况.

参照Laviolette和Athrow^[23]的下胚轴创伤法进行接种. 用解剖刀在大豆合丰 35 子叶下 1 cm处向下划约 0.5 cm长的伤口, 用移液器吸取 20 μL单孢株游动孢子悬浮液滴于伤口处. 接种等量的P6497 游动孢子悬浮液作为实验对照. 所有处理的大豆植株于 25℃下孵育. 接种 24 h后用镊子撕取接种点附近下胚轴表皮在光谱激光扫描共聚焦显微镜下进行侵染菌丝的显微观察.

取生长了 10 d的大豆合丰 35 和南农 8848 以及威廉姆斯和威廉姆斯 82 的幼根, 浸泡于游动孢子悬浮液(5×10^4 个孢子/mL)中, 25℃下孵育. 接种 2 h后于 Leica荧光显微镜下观察疫霉的根部侵染. 利用接目测微尺计测法^[30]进行休止孢芽管长度的测量, 每个视野随机测定 20 个芽管长度.

2 结果与分析

2.1 GFP 转化大豆疫霉的结果

质粒 pTH210(图 1)的基本结构是: 莴苣盘梗霜霉 *Bremia lactucae* 的 *hsp70* 启动子, 连接作为选择标记的潮霉素磷酸转移酶 *hpt* 基因和 *B. lactucae* 的 *ham34* 终止子. 载体 pHSPN (图 1)由抗遗传霉素的新霉素磷酸转移酶 *npt II* 基因取代载体 pTH210 中潮霉素磷酸转移酶 *hpt* 基因而来, 其余元件相同. 载体 p210-ACGFP (图 1)由 *gfp* 基因编码序列替代 pTH210 中潮霉素磷酸转移酶 *hpt* 基因而来.

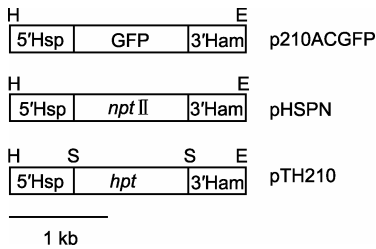


图 1 转化载体图谱

hpt, 潮霉素磷酸转移酶基因; *npt II*, 新霉素磷酸转移酶基因; *gfp*, 绿色荧光蛋白基因; H, *HindIII*; E, *EcoR I*; S, *Sma I*

通过将载体 p210ACGFP 和 pHSPN 共转化 P6497 菌株, 总共获得 37 个假定的 *hsp70-gfp* 转化子(GFP1-GFP37). 为验证这些假定的转化子是否表达 GFP, 利用荧光显微镜检查每一个转化子的荧光发射情况, 最后得到 2 个可以表达 GFP 的转化子 GFP1 和 GFP2.

2.2 GFP 转化子的遗传稳定性分析

结果发现, 转化后再生形成的转化子中 94.6% (35/37)不表达GFP, 原因可能为: 疫霉菌的菌丝体无隔多核, 在遗传转化过程中形成的原生质体包含核的情况复杂^[23], 采用的抗药性选择标记*npt II* 基因和目的基因*gfp*序列分别位于不同的载体上, 降低了这两个基因共同转化进大豆疫霉基因组的几率. 用荧光显微镜检测得到的 2 个*hsp70-gfp*转化子GFP1 和 GFP2 的菌丝, 发现每个转化子都仅有部分的菌丝能发射荧光, 因此分别对这两个转化子进行单游动孢子分离纯化, 共获得 5 个含GFP的单游动孢子菌株, 其中单孢株T1 和T2 来自亲本GFP1, T3, T4 和T5 来自 GFP2 (表 1). 经检测上述 5 个单孢株的所有菌丝和游动孢子囊、游动孢子、休止孢和卵孢子都可激发荧光 (图 2), 证明上述 5 个单孢株为同核体.

表 1 GFP 转化子及单游动孢子菌株的数量统计^{a)}

类别	数目
抗 G418 的转化子	37
表达 GFP 的转化子	2
挑取的单游动孢子总数	216
表达 GFP 的单游动孢子后代	5

a) 表达 GFP 的转化子为 GFP1 和 GFP2, 各挑取其单孢后代 108 个. 单孢株 T1 和 T2 来自亲本 GFP1, T3, T4 和 T5 来自 GFP2

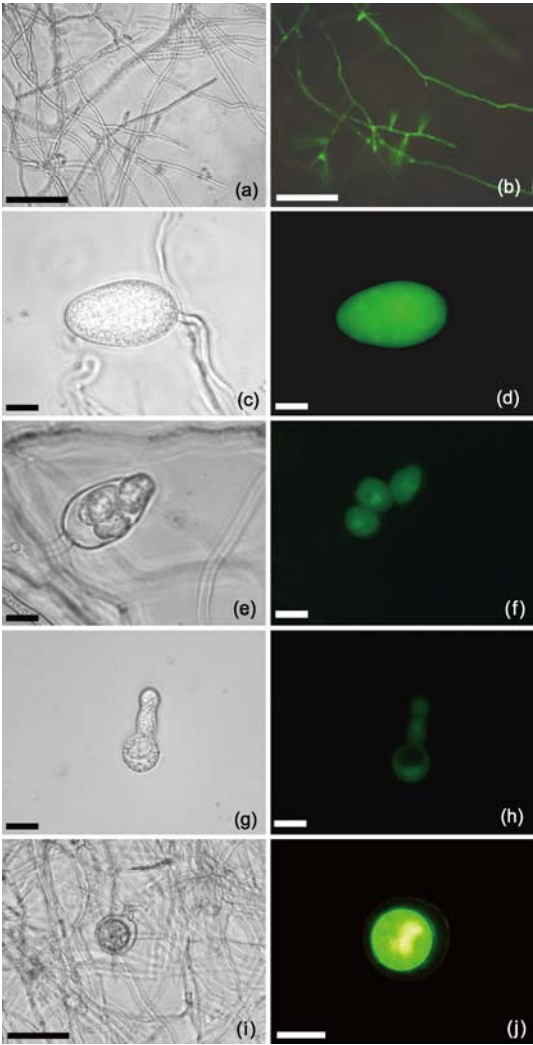


图 2 含 GFP 的大豆疫霉菌株 T1 不同发育阶段 GFP 的表达 (a)和(b) 营养菌丝阶段; (c)和(d) 游动孢子囊阶段; (e)和(f) 正在释放游动孢子的孢子囊; (g)和(h) 正在萌发的休止孢; (i)和(j) 卵孢子. (b), (d), (f), (h)和(j)是在蓝光激发下 GFP 表达的照片; (a), (c), (e), (g)和(i)是右边对应位置的细胞在可见光下的照片. (a), (b), (i)和(j), $\times 200$; (c)~(h), $\times 400$

将上述转化子与其野生型亲本进行生物学性状比较, 结果显示(表 2), 上述转化子的致病力没有显

表 2 大豆疫霉转 GFP 菌株的单孢后代与受体菌株生长速率和对大豆品种合丰 35 致病性的比较^{a)}

菌株	生长速率/mm·d ⁻¹ ^{b)}	病斑长度/cm ^{b)}
P6497 (对照)	5.7a (0.129)	5.23a (0.099)
T1	5.5a (0.128)	5.03a (0.115)
T2	5.2a (0.163)	5.14a (0.119)
T3	5.4a (0.216)	4.96a (0.155)
T4	5.5a (0.214)	5.20a (0.200)
T5	5.1a (0.177)	5.18a (0.144)

a) 生长速率是每个菌株 5 个重复的测定结果, 共测定 3 次; 致病性评价依据的是每个菌株在 10 株大豆上产生的病斑长度, 测定结果重复 3 次. b) 括号里数据表示标准差. 单孢株 T1 和 T2 来自亲本 GFP1, T3, T4 和 T5 来自 GFP2. 字母 a 表示采用新复极差法比较差异显著性($P < 0.05$)

著变化; 生长速率与亲本菌株相似, 为 5.3 mm/d.

此外, 上述转化子的菌落特征(形状和颜色)、孢子囊和卵孢子产量与野生型亲本菌株相比, 也没有表现出显著差异. 选取菌株 T1 作为以下分析用的转 *gfp* 菌株.

2.3 GFP 示踪大豆疫霉感染过程

在菌株 T1 的游动孢子接种合丰 35 叶片 24 h 后, 对叶片进行酒精脱色, 用激光共聚焦扫描显微镜在接种点附近进行显微观察. 结果(图 3)显示游动孢子已经萌发并且成功感染叶片, 在其内部形成菌丝进行扩展. 在下胚轴接种 24 h 后, 撕取接种点附近的表皮直接进行激光共聚焦扫描显微镜的观察, 同样可观察到游动孢子已经在下胚轴内萌发感染, 菌丝在植株体内扩展, 并且可见菌丝在植物细胞间扩展; 而在可见光下观察, 检测不到叶片和下胚轴内病原菌的存在(图 3).

为模拟自然条件下大豆疫霉菌的感染, 将大豆合丰 35 的侧根浸泡于 T1 游动孢子悬浮液中(5×10^4 个孢子/mL), 分别于接种后 2, 4 h 选取侧根进行荧光显微观察. 结果(图 4)显示, 接种 2 h 后, 游动孢子在寄主根部表面形成了明显的附着胞或类似附着胞结构; 4 h 后, 游动孢子形成的附着胞已经成功感染进寄主根部.

2.4 亲和与非亲和互作芽管长度的比较

用 T1 的游动孢子悬浮液(5×10^4 个孢子/mL)浸泡接种大豆合丰 35 和南农 8848 的幼根, 接种 2 h 后于荧光显微镜下观察大豆疫霉在根部的感染. 结果(图 5)表明, 在抗病的南农 8848 根部游动孢子萌发形成

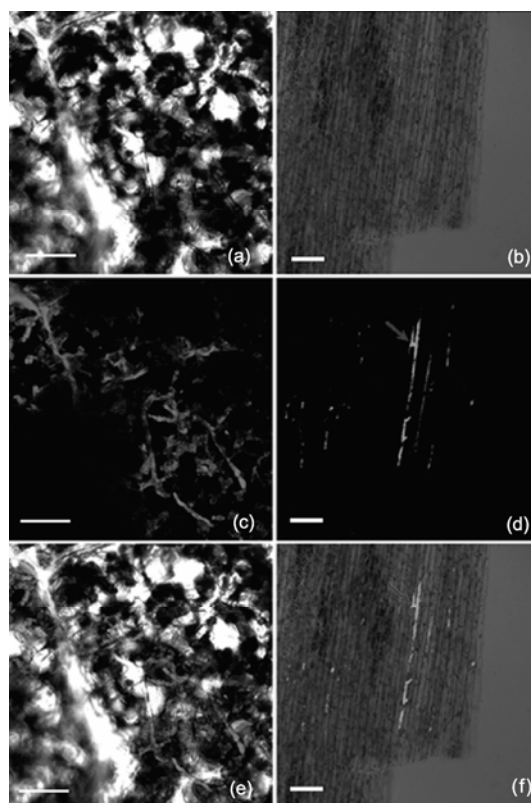


图 3 大豆疫霉在大豆合丰 35 叶片和下胚轴内的感染情况

(a), (c), (e)为同一个叶片组织; (b), (d), (f)为同一个下胚轴组织. (a)可见光下的叶片; (c)和(e)蓝光激发下大豆合丰 35 叶片内的感染菌丝; (b)可见光下的下胚轴照片; (d)和(f)蓝光激发下大豆合丰 35 下胚轴内的感染菌丝. 箭头表示细胞间扩展的菌丝. (c)和(d)蓝光激发照片; (e)和(f)蓝光激发, 在明亮视野下的照片. (a), (c), (e) 标尺 40 μm ; (b), (d), (f)标尺 80 μm

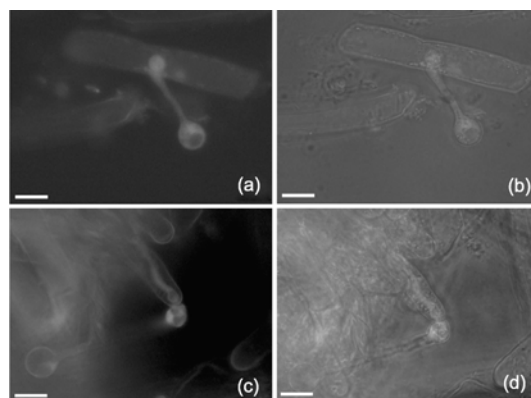


图 4 大豆疫霉感染大豆合丰 35 根部状况

(a)和(b) 接种后 2 h 的大豆根部; (c)和(d) 接种后 4 h 的大豆根部; (a)和(c) 蓝光激发下的照片; (b)和(d) 蓝光激发, 明亮视野下的照片. 标尺示 10 μm

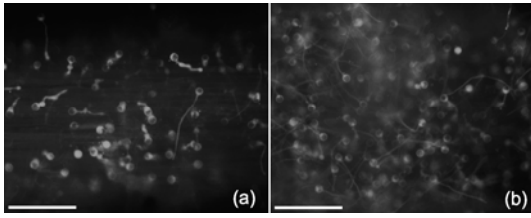


图5 不同抗性品种根部表面的大豆疫霉游动孢子
照片拍摄于接种后 2 h. (a) 感病品种合丰 35 根部表面;
(b) 抗病品种南农 8848 根部表面. 标尺示 100 μm

的芽管明显长于在感病品种合丰 35 根部形成的芽管, 接种 2 h 后利用接目测微尺进行测量, 南农 8848 根部萌发的芽管平均长度为 $(36.7 \pm 11.10) \mu\text{m}$, 合丰 35 根部萌发的芽管平均长度为 $(14.8 \pm 2.98) \mu\text{m}$; 并且, 合丰 35 上萌发的芽管粗大, 而南农 8848 上萌发形成的芽管细长. 在威廉姆斯和威廉姆斯 82 组合上也观察到同样的结果, 即在抗病的威廉姆斯 82 根部萌发的芽管平均长度 $(30.9 \pm 11.80) \mu\text{m}$ 长于在感病的威廉姆斯根部萌发的芽管平均长度 $(15.7 \pm 6.28) \mu\text{m}$; 并且后者上萌发的芽管较前者粗大.

3 讨论

本研究利用 CaCl_2 -PEG 转化方法将含报告基因 *gfp* 的载体转化进大豆疫霉并成功表达 *gfp* 基因. 利用荧光显微镜观察了 *gfp* 基因在大豆疫霉不同发育阶段的表达. 而且, 利用该报告基因系统研究了大豆疫霉在寄主叶片、下胚轴和根部的侵染行为以及显微分析了寄主抗性在根部的显微差异. 结果表明 GFP 可以作为大豆疫霉遗传研究中有用的分子标记, 为将来研究大豆疫霉的侵染动态、不同发育阶段基因表达定位以及基因诱导表达等提供了良好的报告基因系统.

由于大豆疫霉对大豆生产的严重破坏性, 其研究一直备受人们关注, 随着大量 EST 序列的产生和全基因组序列的公布, 大豆疫霉逐渐成为研究卵菌生长发育和致病机制的模式生物^[6,31,32].

将外源 DNA 转化进疫霉属主要是使用 Judelson 等人^[11]建立的 CaCl_2 -PEG 介导的原生质体转化方案. 利用该方法已经成功将标记基因在疫霉菌一些种中进行了表达, 如 *gus* 基因在 *P. infestans* 中的表达^[12,13,18], *gfp* 基因在 *P. palmivora*^[14], *P. parasitica* var. *nicotianae*^[15,16] 和 *P. brassicae*^[17] 中的表达. 本文首次报道将 *gfp* 基因转入大豆疫霉进行了稳定表达, 并进行了

相关研究.

本研究使用的 *gfp* 编码序列已经过序列改造, 密码子得到了优化, 与野生型相比发射荧光强度得到了增强; 其 mRNA 的翻译效率也得到了提高, 更适合在真核细胞中表达 (<http://www.clontech.com/images/pt/PT3933-5.pdf>). GFP 在蓝光的激发下数分钟内就可产生明亮的绿光, 它的发光不需要额外的蛋白、底物、辅助因子或酶促反应的协助^[33]. 大豆疫霉细胞表达的 GFP 荧光也非常稳定, 不会遭受光漂白, 足以用来进行大豆疫霉的相关研究. GFP 荧光主要用于活体细胞检测, 对于单个细胞的分析非常方便, 但是它最大的不足是不能进行细胞群体以及细胞间互作的研究. 另外一个常用的 GUS 报告基因系统^[18]非常利于肉眼观察 GUS 的表达, 但它的酶促染色反应会杀死组织, 而 GFP 系统不用处理组织就可以观察, 所以在针对疫霉一些发育阶段的研究特别是针对疫霉游动孢子阶段的研究时 GFP 系统具有明显的优点. GFP 适合未来大豆疫霉不同发育阶段基因表达的活体分析.

本研究将 GFP 成功转入大豆疫霉, GFP 对受体大豆疫霉没有产生明显的毒性, 在大豆疫霉各发育阶段稳定表达. 利用 GFP 报告基因系统显微观察了大豆疫霉在大豆叶片、下胚轴和根部内的扩展情况. 结果显示该报告基因在大豆疫霉遗传研究中具有良好的应用前景.

研究者进行植物抗病性的衡量时一般采取估计植物病斑大小或者植物体上孢子形成数量等方法, 这样的方法一般需要较长的时间而且带有主观因素^[17]. Wubben 等人^[20]将报告基因 *gus* 转入 *C. fulvum* 并表达, 通过分光光度法测定了 GUS 蛋白的活性来估测不同抗性寄主体内病原菌的生物量. 本研究利用 GFP 系统比较了不同抗性水平的大豆品种抗大豆疫病在根部的差异, 大豆疫霉游动孢子在抗病品种根部萌发产生的芽管长于游动孢子在感病品种根部萌发形成的芽管; 并且, 感病品种上萌发的芽管比较粗大, 而抗病品种上萌发形成的芽管细长. 这是首次从显微的角度解析大豆抗疫病在根部的差异. Bignell^[34]和 Lapwood^[35]都发现寄主相对高的抗性会延缓致病疫霉附着胞形成, 导致芽管伸长, 本文研究结果佐证了 Bignell 和 Lapwood 的发现. 以上的结果为从细胞水平上了解大豆抗疫病机制提供了参考性数据.

将报告基因 *gfp* 应用到大豆疫霉的分子生物学研

究上,未来可实现实时分析游动孢子等卵菌特有阶段中基因的表达情况;带有GFP标记可示踪遗传修饰菌株的动态变化,分析土壤和水生态系统中卵菌的空间分布^[36],衡量寄主植物对疫霉菌的抗性水平^[17],这些都预示着该报告基因系统在疫霉菌研究中具有广泛的应用前景.

致谢 感谢美国 Virginia Polytechnic Institute and State University 的 Brett M Tyler 教授提供大豆疫霉菌株 P6497、质粒 pHSPN 和大豆威廉姆斯和威廉姆斯 82. 感谢 University of California, Riverside 的 Howard S Judelson 教授馈赠质粒 pTH210. 感谢国家大豆改良中心(江苏省南京市)惠赠大豆合丰 35 和南农 8848. 感谢 Karl Kerner (AGRO LINGUA, Måltrostvn. 1A, NO-3142 Vestskoge, Norway)帮助修改英文文稿.

参考文献

- 1 Erwin D C, Riberro O K. *Phytophthora* Diseases Worldwide. St. Paul: APS Press, 1996
- 2 Kamoun S. *Phytophthora*. In: Kronstad J W, ed. Fungal Pathology. The Netherlands: Kluwer Academic, 2000. 237—265
- 3 Baldauf S L, Roger A J, Wenk-Siefert I, et al. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, 2000, 290: 972—977[doi]
- 4 Kamoun S. Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic Cell*, 2003, 2: 191—199[doi]
- 5 Lamour K H, Finley L, Hurtado-Gonzales O, et al. Targeted Gene Mutation in *Phytophthora* spp. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2006, 19: 1359—1367[doi]
- 6 Tyler B M. *Phytophthora sojae*: Root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Mol Plant Pathol*, 2007, 8: 1—8[doi]
- 7 Latijnhouwers M, de Wit P J G M, Govers F. Oomycetes and fungi: Similar weaponry to attack plants. *Trends Microbiol*, 2003, 11: 462—469[doi]
- 8 Ward E W B, Cahill D M, Bhattacharyya M K. Early cytological differences between compatible and incompatible interactions of soybeans with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1989, 34: 267—283[doi]
- 9 Enkerli K, Hahn M G, Mims C W. Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete *Phytophthora sojae*. *Can J Bot*, 1997, 75: 1493—1508
- 10 左豫虎, 康振生, 黄丽丽, 等. 大豆疫霉菌对大豆下胚轴侵染过程的细胞学研究. *植物病理学报*, 2005, 35: 235—241
- 11 Judelson H S, Tyler B M, Micheltore R W. Transformation of the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1991, 4: 602—607
- 12 Judelson H S, Micheltore R W. Transient expression of foreign genes in the oomycete *Phytophthora infestans* using *Bremia lactucae* regulatory sequences. *Curr Genet*, 1991, 19: 453—459[doi]
- 13 Kamoun S, van West P, Govers F. Quantification of late blight resistance of potato using transgenic *Phytophthora infestans* expressing β -glucuronidase. *Eur J Plant Pathol*, 1998, 104: 521—525[doi]
- 14 van West P, Reid B, Campbell T A, et al. Green fluorescent protein(GFP) as a reporter gene for the plant pathogenic oomycete *Phytophthora palmivora*. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 178: 71—80[doi]
- 15 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[doi]
- 16 Le Berre J Y, Engler G, Panabieres F. Exploration of the late stages of the tomato-*Phytophthora parasitica* interactions through histological analysis and generation of expressed sequence tags. *New Phytol*, 2007, 177: 480—492
- 17 Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Mauch F. Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: β -aminobutyric acid but not BTH protects potato and *Arabidopsis* from infection. *Mol Plant Pathol*, 2003, 4: 237—248[doi]
- 18 van West P, de Jong A J, Judelson H S, et al. The *ipio* gene of *Phytophthora infestans* is highly expressed in invading hyphae during infection. *Fungal Genet Biol*, 1998, 23: 126—138[doi]
- 19 Judelson H S. Expression and inheritance of sexual preference and selfing potential in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet Biol*, 1997, 21: 188—197[doi]
- 20 Wubben J P, Joosten M H, de Wit P J. Expression and localization of two *in planta* induced extracellular proteins of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1994, 7: 516—524

- 21 郑小波. 疫霉菌及其研究技术. 北京: 中国农业出版社, 1997. 81—122
- 22 McLeod A, Fry B A, Zuluaga A P, et al. Toward improvements of oomycete transformation protocols. J Eukaryot Microbiol, 2008, 55: 103—109[doi]
- 23 Laviolette F A, Athow K L. Physiologic races of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in Indiana, 1973—1979. Plant Dis, 1981, 65: 884—885
- 24 Ward E W B, Lazarovits G, Unwin C H, et al. Hypocotyl reactions and glyceollin in soybeans inoculated with zoospores of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Phytopathology, 1979, 69: 951—955[doi]
- 25 Kaufmann M J, Gerdemann J W. Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora sojae*. Fungal Genet Biol, 1958, 48: 201—208
- 26 Rutherford F S, Ward E W, Buzzel R I. Variation in virulence in successive single zoospore propagations of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Phytopathology, 1985, 75: 371—374[doi]
- 27 Bumbieris M. Characteristics of two *Phytophthora* species. Aust J Bot, 1974, 22: 655—660[doi]
- 28 Bhat R G, Schmitthenner A F. Virulence evaluation of single-oospore culture of various physiologic races of *Phytophthora sojae*. Phytopathology, 1992, 82: 1082—1088
- 29 Bhat R G, Schmitthenner A F. Genetic crosses between physiologic races of *Phytophthora sojae*. Exp Mycol, 1993, 17: 122—129[doi]
- 30 方中达. 植病研究方法. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1996. 119—120
- 31 Tyler B M. Genetics and genomics of the oomycete-host interface. Trends Genet, 2001, 17: 611—614[doi]
- 32 Tyler B M, Tripathy S, Zhang X M, et al. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. Science, 2006, 313: 1261—1266[doi]
- 33 Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 12501—12504[doi]
- 34 Bignell D C. Studies on the prepenetration stage of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary on potato leaves and its relation to general resistance. Dissertation for the Doctoral Degree. Canada: The University of Western Ontario, 1975. 20—100
- 35 Lapwood D H. Observations on the infection of potato leaves by *Phytophthora infestans*. Trans Br Mycol Soc, 1968, 51: 233—240
- 36 Egner T, Hurek T, Reinhold-Hurek B. Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. Mol Plant-Microbe Interact, 1998, 11: 71—75[doi]