

稻恶苗菌异核体三种核型核 DNA 的 RAPD 分析*

陈 希 李秀玉 颜耀祖

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘 要 利用 RAPD 技术,对稻恶苗菌 TJ47-26 异核体的紫、红、白三种核型(同核体)核 DNA 进行比较,用 80 种 10bp 长的随机引物进行 DNA 扩增,共检测了基因组中近 400 个位点,未发现三种核型的基因组间有明显差异,表明紫、红、白三种核型的 DNA 碱基序列高度相似。由此推测 TJ47-26 异核体的三种不同核型是来自同一个核的变异体。

关键词 稻恶苗菌,异核体,RAPD

稻恶苗菌又称赤霉菌(*Fusarium moniliforme* 有性为 *Gibberella fujikuroi*),是一种重要的植物病原真菌,引起水稻恶苗病,导致稻苗的疯长甚至死亡。有重要经济价值的赤霉素是该菌的次级代谢产物。

异核现象在丝状真菌中普遍存在,它被认为是一些病原真菌经常发生变异,造成作物抗病性退化的重要原因。俞大绂教授于 60 年代首次揭示了稻恶苗病菌在自然状态下普遍存在异核现象,并以紫、红、白三种菌落颜色和培养特征,划分出三种核型,不同核型的菌株不仅在色素、菌落形态和孢子形成方面存在明显差异,而且赤霉素产量及致病性也显著不同^[5]。80 年代,国际上仍有关于该菌异核现象以及亲合性的研究报道^[3,8]。由于研究方法和技术的局限,丝状真菌异核体的研究多以表型为依据,集中于异核体的证明,而异核体的遗传等方面的研究,很难深入到分子水平。进入 80 年代末,RFLP、RAPD、DNA 指纹分析等技术快速发展,为异核体分子水平的深入研究提供了可能性。

RAPD(Random Amplification of Polymorphic DNA)是近年来出现的一种 DNA 多态性检测技术,它是利用商品化的随机引物,对目的基因组进行 PCR 扩增,通过电泳检测扩增产物的多态性^[1,4,6,7]。本文试图用 RAPD 技术比较稻恶苗菌异核体三种核型的核基因组 DNA,探讨以色素和其他表型及生理特性划分的紫、红、白三种核型,在 DNA 水平上的异同,为该菌的遗传变异研究打下基础。异核体不同核型 DNA 的碱基序列差异有多大,迄今国内外尚未见报道。运用现代分子生物学技术进行这方面的研究,将有助于深入探讨有关异核体的来源、异核体的遗传与变异等问题。

1 材料和方法

1.1 菌种

新近从天津稻田间采集、分离到水稻恶苗菌 TJ47 菌株,经菌丝尖端切割得到异核体

* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1995 年 8 月 31 日收到。

TJ47-26, 将其进行多次小型分生孢子的单孢分离与纯化, 得到同核型分离子 TJ47-26P (紫色型)、TJ47-26R (红色型)、TJ47-26W (白色型)。

1.2 培养基

PDA 培养基、Leonian 色素培养基^[5]、绿豆汤产大型分生孢子培养基、赤霉素发酵培养基^[5]。

1.3 DNA 的提取与纯化

参考文献[2, 9]。取 4g 用滤纸吸干水分的鲜菌丝, 在液氮中研磨成粉末, 加 20ml 缓冲液 (100mmol/L Tris·Cl pH8.0, 10mmol/L EDTA, 1.4mol/L NaCl, 2%CTAB, 2%β-巯基乙醇), 混匀后于 58℃ 水浴保温 1h。加等体积的氯仿: 异戊醇 (V: V=24: 1), 混合均匀, 于 10000r/min 离心 10min, 吸出上清液, 加 1/10 体积的 10%CTAB, 0.7mol/L NaCl, 混匀, 用等体积的氯仿: 异戊醇 (V: V=24: 1) 再抽提一次, 吸出上清液, 加等体积的异丙醇沉淀 DNA。DNA 沉淀用 70%乙醇洗两次, 抽干后溶于 TE 中。DNA 经 CsCl 密度梯度超速离心, 纯化后保存于 -20℃。

1.4 PCR 反应试剂及仪器

本实验所用随机引物为美国 OPERON 公司和加拿大 British Columbia 大学生物技术实验室产品 (引物的商品编号是: OPA-02, OPA-04, OPA-06, OPA-09, OPA-10, OPA-11, OPA-12, OPA-14, OPA-15, OPA-16, OPA-17, OPA-18, OPA-20, OPK-01, OPK-03, OPK-06, OPK-11, OPK-15, OPK-16, OPK-17, OPK-20, OPY-01-20, 1, 2, 3, 6, 8, 9, 10, 12, 16, 18, 19, 31, 32, 33, 34, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 51, 52, 61, 67, 68, 69, 70, 101, 102, 103, 104, 105, 121, 126, 130, 134, 137), 每个引物长度为 10 个核苷酸。Taq DNA 聚合酶购自中国农业大学生物技术国家重点实验室。4 种脱氧核苷酸 (dNTP) 购自华美生物工程公司。PCR 扩增仪为 IDAHO TECHNOLOGY 公司产品。

1.5 RAPD 反应条件

采用中国科学院植物研究所的反应体系和程序。扩增反应物总体积为 10μl, 其中包括 10mmol/L Tris·Cl pH8.3, 2.0mmol/L MgCl₂, 2.5μg BSA, 1mmol/L 酒石黄, 0.5mg 聚蔗糖, 4 种核苷酸 dNTP 各为 0.2mmol/L, 0.5μmol/L 的引物, 20ng 的稻恶苗菌核 DNA, 1 单位的 Taq DNA 聚合酶。反应程序如下: 前 2 个循环 94℃ 下变性 1min, 37℃ 退火 10s, 72℃ 延伸 20s; 后 38 个循环 94℃ 下变性 2s, 37℃ 退火 7s, 72℃ 延伸 30s; 最后在 72℃ 下保温 4min。整个反应中温度变化的斜率为 8。扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳 4h, 电压为 2.5V/cm, 紫外灯下观察结果并照相。

2 结果和讨论

2.1 稻恶苗菌异核体三种纯核体型比较

稻恶苗菌异核体菌株 TJ47-26 的紫、红、白三种同核型分离后代, 在色素产生、菌落表面性状、产孢能力及赤霉素产量上均显著不同, 结果见表 1。这些结果与 60 年代俞大绂教授等证明稻恶苗菌在自然状态下存在异核体, 且异核体由被称为紫色、红色和白色核型中的两种或三种组成的结果相一致。同时表明稻恶苗菌异核现象是稳定的^[5]。

表 1 稻恶苗菌 TJ47-26 异核体三种核型培养特性比较

Table 1 Comparision of the Cultural Characters of Three Component Nuclear Types of *F. moniliforme* TJ47-26

核 型 Nuclear types	TJ47-26P	TJ47-26R	TJ47-26W
菌落颜色	紫色	红色	白色
Colony colour	purple	red	white
菌落形态	绒状	粉状	絮状
Colony morphology	flocculent mycelia	powdery mycelia	velvety mycelia
产孢能力			
Sporulation	++	+++	+
赤霉素产量			
Gibberella production	++	++++	+

2.2 RAPD 的测试反应

选用 80 种 10bp 长的随机引物,进行稻恶苗菌紫、红、白三个纯核型分离子的核 DNA 扩增。扩增产物分子量在 0.2~2.5kb 之间,多数片段集中于 0.3~1.5kb。由于各引物结合位点在基因组中的分布不同,因而扩增产物的电泳条带数变化很大,有 3 个引物的扩增反应结果无产物,其它引物的产物为 1~9 条电泳带不等。由于基因组中不同基因的拷贝数不同,因而不同引物或同种引物不同条带的扩增效果有很大差异,变化在几十 ng 至 1μg 间。用 80 种引物检测了基因组中近 400 个位点,未找到三种核型 DNA 之间有明显差异,其扩增产物的条带数完全相同,各条带的迁移率和强度也基本相同(图版 I-1~4)。表明三种核型的核 DNA 具有高度同源性。由此推测 TJ47-26 菌株异核体可能来源于 DNA 的突变,三种核型很可能是同一个核型的不同变异体,由于变异只涉及到少数碱基,用目前的 RAPD 等 DNA 多态性检测手段还难以快速、准确地发现三种核型基因组间的微小差异。

三种核型分离后代的表型有许多差异,而其 DNA 又非常相似,这反映了稻恶苗菌基因表达及调控机制的复杂性。稻恶苗菌是真核生物,真核生物基因表达的调控机制远比原核生物复杂,基因的表达除了决定于结构基因序列本身外,还受非编码序列甚至特异生理信号的影响,这在酵母菌及其他丝状真菌中得到证实^[10, 11]。分离核 DNA 的相似是否具有普遍性,还有待用更多的异核体不同核型分离后代进行核 DNA 多态性分析,此外尚需结合多种其他 DNA 多态性分析手段进行进一步的证明。

参 考 文 献

[1] 惠东威,陈受宜. 生物工程进展, 1992, 12(6): 1~5.
[2] 李英波,罗信昌,李 滨,等. 真菌学报, 1995, 14(3): 209~217.
[3] Correll J C, Klittich C J R, Leslie J F. *Mycol Res*, 1989, 93(1): 21~27.
[4] Crowhurst R N, Hawthorne B T, Rikkerink E H A *et al. Curr Genet*, 1991, 20(5): 391~396.
[5] Ming Y N, Lin P C, Yu T F. *Scientia Sinica*, 1996, 15(3): 371~378.

- [6] Nicholon P. *J Phytopathology*, 1993, **83**(9): 1003~1007.
[7] Ouellet T, Seifert K A. *Genetics*, 1993, **139**(3): 261~267.
[8] Puhalla J E, Spieth P T. *Experimental Mycology*, 1983, **7**: 328~335.
[9] Rogers S O, Rehner S, Bledsoe C *et al.* *Can J Bot*, 1989, **67**: 1235~1243.
[10] Rozman D, Jezemik K, Komel R. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, **117**(1): 35~40.
[11] 敖世洲. 真核生物基因的结构与功能. 北京: 科学出版社, 1989.

RAPD ANALYSIS OF THREE DIFFERENT COMPONENT NUCLEAR TYPES FROM *FUSARIUM MONILIFORME* HETEROKARYON TJ47-26

Chen Xi Li Xiuyu Yan Yaozu

(College of Biology, Agriculture University of China, Beijing 100094)

Abstract Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) technique was used to compare the nuclear DNA of different component nuclear types (homokaryons) of *Fusarium moniliforme* TJ47-26, which were designated as W(white), R(red) P(purple) respectively and derived from the one newly isolated heterokaryon. 80 random primers with 10 base pairs were used in RAPD experiments. Nearly 400 loci were detected and no polymorphic difference was found. The banding patterns of three different nuclear types were identical by using different primers. So it is deduced that the three different component nuclear types of *F. moniliforme* heterokaryon TJ47-26 probably came from the variation of the same nucleus.

Key words *Fusarium moniliforme*, Heterokaryon, RAPD

图版说明

Explanation of plate

稻恶苗菌异核体 TJ47-26 菌株的三种核型的 RAPD 电泳带谱: RAPD banding patterns of three different nuclear types segregants from *F. moniliforme* heterokaryon TJ47-26: 1,2,3. 依次为稻恶苗菌紫、红、白三种核型 Stands for purple, red and white nuclear types respectively: OPA, OPY. 10. 101~104, 44, 61, 67~69. 引物 Primer: M₁. λ DNA-HincII 分子量参照物 Marker: M₂. PBR322-HaeIII 分子量参照物 Marker: C. 对照 Control.

沙棘根瘤内生菌的多型性

张吉科 张小民

(山西大学生命科学系 太原 030006)

陆锡芳

(河南省云阳蚕业实验场 云阳 474676)

张国伟

(大同第二制药厂 大同 037000)

摘 要 用透射电子显微镜观察了春、夏、秋、冬四个季节的沙棘根瘤,以及瘤瓣上、中、下三个部位。结果表明,不同季节,不同部位的瘤瓣内,根瘤内生菌有 7 种不同形态。即侵染菌丝体、繁殖菌丝体、营养菌丝体、春孢子及春孢子囊、泡囊、冬孢子及冬孢子囊和类菌体。在多年生珊瑚状的根瘤中,它们的世代交替是:春夏季以侵染菌丝、繁殖菌丝、营养菌丝、春孢子囊及春孢子、泡囊为主;秋冬季以衰退的营养菌丝、衰老泡囊、冬孢子囊和冬孢子、类菌体为主。冬孢子和类菌体是休眠体。

关键词 沙棘,根瘤, *Frankia*, 多型性

1964 年 Becking^[1]首次用透射电镜观察到桉木根瘤内生菌的超微结构,并指出它们属放线菌。1977 年 Becking^[2]又通过根瘤切片确认,非豆科木本植物根瘤是由放线菌目中的 *Frankia* 菌共生引起的。1970 年 Catner 等^[3]观察了沙棘根瘤内生菌的超微结构后指出,内生菌在形态上有菌丝、泡囊和类菌体。泡囊是菌丝顶端膨大而形成的。并进一步讨论了菌丝和泡囊的超微结构特征。1973 年 Cardner^[4]等研究了沙棘根瘤泡囊的形成与发育过程。1974 年 Мийсмеренко^[5]等明确指出沙棘根瘤内生菌是多形态的。1976 年 Gardner^[6]在透射电镜下看到沙棘根瘤内有冬孢子囊和冬孢子。1979 年 Андреева 等^[7]指出越冬后干枯了的菌丝颗粒(类菌体)是内生菌再侵染的形态。1982 年 Shipton^[8]、1984 年杜大至等^[9]从沙棘根瘤中分离出 *Frankia* 菌并回接成功,同时看到了菌丝、泡囊、冬孢子和类菌体。1982 年 Андреева 等^[10]指出泡囊数与活力和固氮力呈正相关。作者近来通过透射电镜又看到了不同形态与功能的菌丝体、春孢子囊和春孢子。并对 *Frankia* 菌的多型性进行了讨论。

1 材料和方法

1.1 材料

在沙棘不同生长季节,分别于 1992 年 10 月 18 日,1993 年 1 月 22 日、4 月 18 日、7 月 2 日,1995 年 5 月 9 日取样于山西省岚县河滩地(海拔 1200m、东经 111°40′02″,

本文于 1995 年 11 月 10 日收到。

北纬 $38^{\circ}16'04''$) 20~30cm 根层中春、夏、秋、冬四种瘤。立即固定于 5% 戊二醛 (0.1mol/L 磷酸盐缓冲液) 中备用。

1.2 方法

用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液冲净材料上戊二醛后,再用含 1% 纤维素酶加 1% 果胶酶, 30℃ 酶解 0.5h。然后将瘤瓣切成上、中、下三个部位。室温下 1% 锇酸后固定 2h, 乙醇逐级脱水, 到 70% 时, 用饱和醋酸铀染色 12h, 最后丙酮梯度置换, Epon812 包埋, 瑞典 LKB 2088 BROMMA ULTRATOME-V 超薄切片机切片, 醋酸铀、柠檬酸铅双染, JEM-100CX II (日) 透射电镜观察照相。

2 结果

2.1 春瘤内生菌的形态特征

从春瘤瘤瓣顶部近分生区超薄切片看到, 侵染菌丝是通过穿越细胞壁向新宿主细胞侵入 (图版 I-1), 正在穿壁的菌丝被包埋在壁内, 菌丝周围细胞壁有局部加厚现象, 菌体电子密度较高, 并有一层被囊包着。侵入新宿主细胞的菌丝是通过宿主细胞原生质“桥”向核附近凝集原生质区侵入 (图版 I-2)。在凝集原生质区内侵染菌丝转变为繁殖菌丝, 其特点是缢缩断裂方式繁殖 (图版 I-3)。侵染与繁殖菌丝最明显特征是整个菌丝体电子密度很高, 看不到内部结构。某些繁殖菌丝一端膨大, 形成一个中空的泡 (图版 I-4), 甚至整个被侵染的宿主细胞内的繁殖菌丝都通过这种方式形成了含有 2~6 个春孢子的春孢子囊 (图版 I-5)。而在同一被新侵染的细胞中, 个别繁殖菌丝一端膨大, 形成了内含中等电子密度的颗粒物质, 并有中间体存在的幼龄泡囊 (图版 I-6)。

2.2 夏瘤内生菌的形态特征

在夏瘤的中、上部瘤瓣的超薄切片中看到, 整个被侵染的细胞完全被营养菌丝和泡囊的复合体所占据 (图版 I-7)。营养菌丝的特征是有明显的分隔与分枝, 每个分隔内能看到一些小液泡、颗粒体和拟核物质, 整个菌丝电子密度较低, 被囊很明显。和春瘤中初生的幼龄泡囊相比, 成熟的泡囊被多条电子密度较低的细线分割成单独的不规则的小区, 小区内有电子密度高的物质, 并可看到有拟核区。成熟泡囊进一步发育产生了明显的质壁分离。这可能是泡囊成熟表现出的标志。

2.3 秋瘤内生菌的形态特征

从秋瘤的上、中部瘤瓣超薄切片看到, 菌丝和泡囊都表现出显著的衰老 (图版 I-8)。菌丝空泡化程度增加, 内含小泡和颗粒大部分消失, 细胞质有局部凝聚现象。泡囊衰老更为明显, 泡囊质壁分离程度增加, 泡囊内分隔线变粗、模糊, 内含物减少, 有些泡囊内含物大量消失, 甚至变成一个空腔。这表明泡囊的死亡。

2.4 冬瘤内生菌的形态特征

从冬瘤的上、中部瘤瓣的超薄切片上看到, 菌丝和泡囊都失去了原来固有的形态 (图版 I-9), 菌丝大都凝缩断裂成杆状、颗粒状或不规则状的类菌体。类菌体的特征是被囊明显加厚, 液泡完全消失, 胞质浓缩成丝、块状, 并凝聚在一起, 所有类菌体都不同程度地产生了轻微质壁分离。泡囊不仅干枯皱缩变形, 而且分隔细线变松, 变粗, 形态模糊, 内含物分散凝聚, 甚至产生空泡。

在冬瘤瘤瓣的上、中部位切片中还看到了冬孢子囊和冬孢子(图版 I-10)。它们和春孢子明显区别是孢子囊内有柳叶状高电子密度聚集区,发育成熟的孢子呈椭圆型,质地硬而脆,以至于在切片时将其部分结构切掉(图版 I-11)。

3 讨论

作者所看到的沙棘根瘤内 *Frankia* 菌的再侵染过程和 Berry^[11] 观察 *Frankia* 菌对桉木根毛侵染过程有着十分相似之处。被侵染的细胞壁能迅速形成不规则的电子密度中等的沉积物(deposit),这些沉积物不仅局部加厚了侵染位点及附近的细胞壁,而且也迅速转移到菌体上形成了菌体终身最外层保护结构——被囊(encapsulation)。被侵染的细胞在菌体未侵入细胞前就迅速转变成传递细胞^[4, 11, 12]。侵染菌丝沿胞质桥进入新侵染的细胞是作者首次看到的。宿主细胞细胞质凝聚在核周围,可能是为侵入菌丝提供充足的营养有关。

从不同季节的根瘤中作者看到有四种不同形态与功能的菌丝体,即侵染菌丝、繁殖菌丝、营养菌丝和类菌体。侵染菌丝和繁殖菌丝在外观上都是电子密度很高的杆状体。它们主要区别在于前者小,后者大。繁殖菌丝体由于获得了宿主胞质营养而迅速生长。营养菌丝体特点更为明显:体积大,整个菌体电子密度降低,胞质分化出液泡和颗粒体,菌体有明显分隔和分枝,具有形成泡囊^[3]和类菌体的功能。类菌体是成熟菌丝体在遇不良条件时保存生命的休眠体,它是越冬后萌发为新侵染菌丝体的基础^[7]。

春孢子囊和春孢子是作者首次看到的(图版 I-5),它只发生在春瘤瘤瓣顶部近分生区中皮层刚被侵染的细胞内,是由分裂菌丝体分化而成。它的存在可能是侵染分裂后的菌丝体复壮的一条重要途径。它可以不经休眠便萌发为新的菌丝体。因为在春瘤瘤瓣的中、下部和夏、秋瘤中没有看到春孢子的存在。这个问题还有待于进一步研究。

泡囊是固氮场所^[13]。泡囊除营养菌丝由顶端膨大而形成外^[3],作者看到它还可以由刚分裂后的菌丝体一端膨大而形成(图版 I-6)。有人报道^[5],泡囊也可以分化为类菌体。而其他学者^[3, 4, 7]和作者大量观察结果看到,泡囊通过衰老而解体,转变为类菌体的可能性较小。

冬孢子囊和冬孢子是营养菌丝体遇不良条件下分化的休眠体,它可以萌发为新的菌丝体。

综上所述,在多年生沙棘珊瑚状的根瘤中,*Frankia* 菌的多型性表现为:春夏季被侵染的根瘤细胞中,以侵染菌丝、繁殖菌丝、春孢子囊和春孢子、营养菌丝和泡囊组成的复合体为主;秋冬季又以衰老的营养菌丝、衰退泡囊、冬孢子囊和冬孢子、类菌体组成的复合体为主。它们之间在世代交替中的关系尚需进一步研究。

致谢 电镜照片由中国核防护研究院电镜室赖炽香先生协助拍照,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Becking J H, De Bore W E, Houwink A L. *J Microbiol and Serol*, 1964, **30**(4): 343~376.
- [2] Becking J H. Endophyte and Association Establishment in non-Leguminous Nitrogen-fixing Plants. In: Recent Developments in Nitrogen Fixation. London: Acad Press, 1977. 551~567.
- [3] Catner E M S, Cardner I C. *Arch Mikrobiol*, 1970, **70**(3): 183~196.
- [4] Cardner I C, Catner E M S. *Arch Mikrobiol*, 1973, **89**(3): 233~240.
- [5] Майстренко Г Г, Яковлева З М, Майстренко А Г. *Микробиология*, 1974, **3**: 504~506.
- [6] Cardner I C. Ultrastructural Studies of the non-Leguminous Nodules. In: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cambridge: Cambridge Univ Press. 1976. 486~495.
- [7] Андреева И Н, Симонов И Н, Тибилов А А. *Краткие Сообщения*, 1979, **4**: 186~191.
- [8] Shiptou W A, Burggraaf A J P. *Plant and Soil*, 1982, **69**: 149~161.
- [9] 杜大至, 王毅岩, 崔国良. *微生物学报*, 1984, **24**(1): 41~45
- [10] Андреева И Н, Фклорова Е З, Ильясова В Б. *Физиология Растений*, 1982, **29**(1): 127~135
- [11] Berry A M, McIntye L, McCully M E. *Can J Bot*, 1986, **64**: 292~305.
- [12] Newcomb W, Peterson R L. *Can J Bot*, 1979, **57**(23): 2583~2602.
- [13] Akkermans A D L. Nitrogen Fixation and Nodulation of *Alnus* and *Hippophae* Under Natural Conditions. Leiden: Thesis der Rijks-Universiteit, 1971. 85~95.

THE DIVERSITY OF ROOT NODULE ENDOPHYTE OF *HIPPOPHAE RHAMNOIDES*

Zhang Jike Zhang Xiaomin

(Department of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Lu Xifang

(Yunyang Sericulture Experiment Farm, Yunyang 474676)

Zhang Guowei

(The Second Pharmacy Factory of Datong, Datong 030700).

Abstract The root nodules of *H. rhamnoides* and the upper, middle and lower parts of the nodule, in the four seasons of a year, were observed under transmission electron microscope. And the findings are that the root nodule endophyte has seven shapes in different parts of the nodule in different seasons: infectious mycelium, reproduceable mycelium, vegetative mycelium, spring sporangium and spring spore, vesicle, winter spore and winter sporangium, and bacteroid-like cell. In the perennial coralloid root nodules, their alternation of generations is infectious mycelium, reproduceable mycelium, vegetative mycelium, spring sporangium and spring spore, and vesicle in spring and summer; and vegetative mycelium, decaying vesicles, winter sporangium and winter spore and bacteroid-like cell in autumn and winter. Winter spore and bacteroid-like cell are dormant body.

Key words *Hippophae rhamnoides*, Root nodule, *Frankia*, Diversity