

炭疽菌不利用硝酸盐突变体的筛选及鉴定

冯 红 张义正

(四川大学生命科学学院 成都 610064)

摘要: 将从杉木和大叶黄杨上分离获得的 8 个胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 分离物培养在含氯酸钾的平板上, 得到快速生长抗氯酸钾的不利用硝酸盐的突变体 (Nit)。所有的突变体经鉴定分属于 3 种表现型, 即硝酸还原酶结构位点 (nit1), 硝酸盐同化途径的专化调节位点 (nit3), 和钼辅因位点 (nitM)。分离物发生突变的频率随氯酸钾浓度的增加而提高, 并且不同的氮源在一定程度上会影响突变表型种类。除 CC3 外, 所有的分离物都是自身亲和的, 即不同表型的突变体能遗传互补, 其中来源于杉

收稿日期: 1999-04-19, 修回日期: 1999-11-01

木上的两个分离物属于同一个营养体亲和群(VCG),其余的分离物属于不同的VCG群。

关键词: 胶孢炭疽菌,不利用硝酸盐突变体,硝酸还原酶,营养体亲和群。

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)05-0341-05

SELECTION AND IDENTIFICATION OF NITRATE NON-UTILIZING MUTANTS OF *COLLECTOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES*

FENG Hong ZHANG Yi-Zheng

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract: Eight isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from host plants *Cunninghamia lanceolata* and *Euonymus japonicum*, respectively, were cultured on MMC medium containing $KClO_3$ to select chlorate-resistant and nitrate non-utilizing mutants (Nit). All the Nit mutants obtained by this way belong to one of 3 kinds of the following phenotypes: the nitrate reductase structural locus (nit1), the nitrate-assimilation pathway-specific regulatory locus (nit3), and the molybdenum-containing cofactor locus (nitM). The higher mutation frequency on MMC amended with increasing concentration of $KClO_3$ was induced, and various nitrogen sources were able to influence production of the phenotypic classes. Seven of the 8 isolates tested were self-compatibility in which the two mutants with different phenotypes from the same isolate could genetically complement. The two isolates from *C. lanceolata* belong to the same vegetative compatibility group (VCG), the other six isolates belong to distinctive VCGs.

Key words: *Colletotrichum gloeosporioides*, Nitrate non-utilizing mutants (Nit), Nitrate reductase, Vegetative compatibility group (VCG)

胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 分布广泛,能侵染多种不同的植物,是一种重要的植物病原真菌,为此在病理学等方面进行了较多的研究。胶孢炭疽菌在培养过程中其形态往往发生较大的变化,具有一定的寄主专化性,来自田间的证据也表明,该菌以异源的群体存在^[1]。因此,分析其群体结构以及与致病力的关系具有特别重要的意义,现已应用同工酶、有性重组、DNA及染色体多态性等方法来研究其群体构成,但很难与致病力联系起来。

丝状真菌在利用硝酸盐作氮源时,需要硝酸还原酶、亚硝酸还原酶以及调控蛋白分几步将硝酸盐还原为氨态而被利用,其中有关的基因位点在一些真菌中较容易发生突变,成为不能利用硝酸盐的突变体 (Nit)^[2]。有研究者把这些突变体作为遗传互补的受体菌应用于丝状真

菌的转化^[3],为这些真菌的基因操纵奠定了基础;也有的将其用于菌丝体亲和性的研究^[4,5],为无性繁殖的真菌的群体结构分析提供了又一条途径,更重要的是在有的病原真菌中还发现营养体亲和群(VCG)与致病力存在一定的相关性^[5]。

本文报道胶孢炭疽菌不利用硝酸盐突变株的筛选及其影响因素,以期将突变的基因位点作为遗传标记探讨不同分离物菌丝体的亲和性,分析炭疽菌群体结构;同时也可用于互补作用克隆相应的基因,以此建立胶孢炭疽菌的转化系统。

1 材料与方法

1.1 胶孢炭疽菌株

从杉木 (*Cunninghamia lanceolata*) 和大叶黄

杨(*Euonymus japonicum*)的病叶中分离到8个分离物,经鉴定为胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)^[6],这8个分离物在PDA和

C32N22培养基上的形态和产孢特性均有一些差异,见表1。

1.2 培养基

表1 胶孢炭疽菌分离物在MMC平板上Nit突变的频率和表型比较

分离物	寄主	色素 ^a		产孢 ^b		突变频率	各类表型的比率		
		PDA	C32N22	PDA	C32N22		nit1	nit3	nitM
CC1	杉木	-	-	++	++	1.00	10.0	80.0	10.0
CC2	杉木	++	+	-	+++	1.10	45.5	54.5	0.0
CC3	杉木	++	+	+	++	0.71	60.0	40.0	0.0
CL1	大叶黄杨	++	-	+	+++	0.71	40.0	60.0	0.0
CL2	大叶黄杨	+	-	+	+	0.14	100	0.0	0.0
CL3	大叶黄杨	++	-	+	+++	0.0	00.0	0.0	0.0
CL6	大叶黄杨	++	-	+	+++	0.33	100	0.0	0.0
CL9	大叶黄杨	+	-	-	+ ^c	0.60	57.1	28.6	14.3

a -表示无明显色素,+表示色素少,++表示色素多、明显,b -经显微检查无孢子,+显微检查有孢子,++显微检查孢子多,+++肉眼可见桔黄色孢子堆,c 经显微检查产生子囊孢子

马铃薯葡萄糖培养基(PDA):用于一般的培养和保存,以及观察各分离物的培养特性。

C32N22培养基^[6]:用途同上,但特别适宜于胶孢炭疽菌产孢。

基本培养基(BM)^[4]:用于组合不同用途的培养基。

诱导培养基(MMC):在1L BM中加入1.6g 天冬酰氨、2.5g 硝酸钠、15g 氯酸钾,用于诱导筛选突变体。

完全培养基(CM):参照 Correll(1987)^[4],作了一些修改,即在1L BM培养基中加入硝酸钠2g,胰蛋白胨2.5g,酵母浸出汁2.0g,维生素溶液10mL(500mL 50%的乙醇中含肌醇1mg,硫胺素50mg,核黄素15mg,盐酸吡哆醇40mg),用于培养和保存突变株。

表型鉴定培养基:硝酸盐培养基(MM),1L BM中加硝酸钠2.5g;亚硝酸盐培养基(NM),1L BM中加亚硝酸钠0.5g;次黄嘌呤培养基(HM),1L BM中加次黄嘌呤0.2g,尿酸培养基(UM),1L BM中加尿酸0.2g;铵盐培养基(AM),1L BM中加酒石酸铵1.0g,用1N氢氧化钠调pH6.5。

1.3 Nit 突变株的诱导和表型鉴定

在预备实验的基础上,将培养于PDA平板上的菌丝体,挑取约4mm²大小的菌丝块转移到20个MMC和10个不同氮源和不同浓度的硝

酸钾的MMC平板中央,25℃持续荧光灯照射下培养,随时挑取快生的菌落移植到CM平板上保存,再将这些菌株转接到MM平板上,鉴定得到不利用硝酸盐的突变株,最后再将这些突变株转接到不同的表型鉴定平板上,确定各突变株的表型。

在MMC中,分别加入0.5g/L的谷氨酸、天冬酰氨、亚硝酸钠、尿酸、酪蛋白水解物作为氮源;在MMC中,再分别加入8、12、15、20、25、30、40g/L的氯酸钾,按上述方法测定不同氮源和不同浓度的氯酸钾对4个分离物突变频率和表型的影响。

1.4 Nit 突变株间的遗传互补测定

在MM平板上间隔1cm左右分别转接来自于同一或不同分离物的不同表型的突变株配对培养测定其菌丝体间的亲和性,每个测定至少重复两次。

2 结果与讨论

2.1 Nit 突变体的诱导筛选

供试的8个*C. gloeosporioides*分离物在MM培养基上都能像在PDA和C32N22培养基上都能形成浓密的菌丝体。当移植到含氯酸钾的MMC培养基上,由于氯酸钾认为是硝酸盐的类似物,从而在硝酸盐代谢过程中产生细胞毒性,野生型的菌丝生长就会停止或受到抑制,因此最初移植的菌落生长都受到不同程度的抑

制。分离自杉木的3个分离物对氯酸钾的抗性低于分离自大叶黄杨的5个分离物,其中CL6的氯酸钾抗性最高。当继续培养4~10d,从受抑制的菌落或原接种的菌丝块上会出现突变体,生长的气生菌丝明显加快,形成旺盛的扇形菌落或整体菌落(见图1A),立即将其转接到CM培养基上保存。然后再移植到MM培养基上鉴定是否突变。突变体的菌落形态明显不同于野生型,即菌丝体稀薄平铺于培养基上,这就是抗氯酸钾的并且不能利用硝酸盐作为氮源的突变体。但是,不同的分离物在MMC平板上获得突变体的频率存在显著的差异(表1),突变频率的高低与其对氯酸钾的抗性有很大的关系。

表3 不同氮源对胶孢炭疽菌nit突变和表型的影响^a

分离物	天冬酰胺				谷氨酸			酪蛋白水解物			亚硝酸钠			尿酸						
	频率	nit1	nit3	nitM	频率	nit1	nit3	nitM	频率	nit1	nit3	nitM	频率	nit1	nit3	nitM	频率	nit1	nit3	nitM
CC2 ^a	1.4	6	8	0	nd ^{**}				1.0	6	4	2	1.0	10	0	0	1.0	6	4	0
CC3 ^b	0.9	5	4	0	1.2	12	0	0	1.3	10	3	0	1.0	10	0	0	1.1	2	8	1
CL3 ^b	1.1	7	4	0	0.9	7	2	0	1.3	9	10	0	0.9	8	1	0	1.0	7	3	0
CL9 ^a	0.2	2	0	0	0.6	3	1	0	0.4	0	0	2	0.4	4	0	0	0.2	2	0	0

^a频率表示每皿出现突变株的平均数,数值表示各表型的突变株数,**此项实验未做,a、b表示在诱变培养基中分别加入15g/L、20g/L的氯酸钾

2.2 Nit 突变株表型的鉴定

将所有的突变株培养在5种不同氮源的鉴定培养基上,根据生长情况,鉴定出3种表型。参照在 *Fusarium*^[7] 中的类似命名方法,将这3种不利用硝酸盐突变体的表型分别命名为硝酸还原酶结构位点(nit1)、硝酸盐同化途径的专化调节位点(nit3)、钼辅因位点(nitM)。不同分离物诱导突变体出现3种表型的比率存在明显的差异,其中的表型大多为 nit1,其次是 nit2,而 nitM 出现较少。不同的氮源对 Nit 突变体的表型的影响见表3。换用不同的氮源能增加一些分离物突变体表型的种类,但同一种氮源对不同分离物的影响却不一致。

2.3 遗传互补测试及 VCG 群

将来自于同一分离物和不同分离物的不同表型的 Nit 突变株接种到 MM 培养基上配对培养,在1~3周时间内,如果配对的两个突变株的菌丝体是亲和的,在菌落的接触处就会出现浓密的野生型菌丝体,明显地区别于突变株稀薄平铺

不同浓度的氯酸钾和不同氮源对诱导分离物突变的影响见表2、3。突变频率一般随氯酸钾浓度的增高而上升,但达到一定浓度后不再上升,且不同的分离物由于对氯酸钾的抗性不同,其突变适宜的浓度也不同。不同的氮源对突变频率影响不大。

表2 氯酸钾浓度对胶孢炭疽菌Nit突变频率的影响^a

分离物	氯酸钾浓度(g/L)						
	8	12	15	20	25	30	40
CC1	0.71	1.00	1.00	nd ^{**}	nd	nd	nd
CC2	0.72	1.00	1.00	nd	nd	nd	nd
CL4	nd	nd	nd	0.14	0.29	1.14	1.00
CL6	nd	nd	0.00	0.00	0.67	1.00	1.33

^a每皿产生突变的平均数,**此项实验未做

的菌丝(见图1C、D)。这被认为是不同表型的 Nit 突变株之间菌丝细胞融合形成异核体,在遗传上产生互补作用所致。因此,在测试中无论是同一分离物还是不同的分离物,只有表型不同的

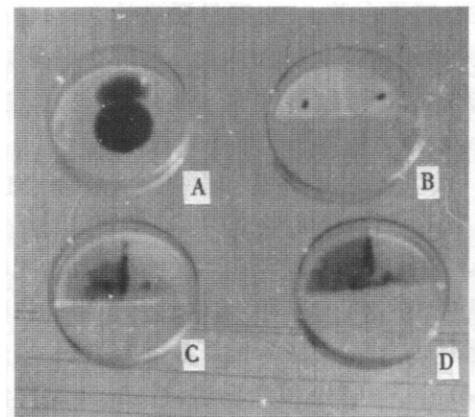


图1 胶孢炭疽菌产生的突变体和不同表型的突变体间的遗传互补

A Nit的产生,B CC3的nit1之间不能遗传互补, C CL1的nit1与nit3之间的遗传互补,D CC1的nitM与CC2的nit1之间的遗传互补

Nit突变株才能互补,出现野生型的菌丝体。在供试的8个分离物中,7个分离物的不同表型的Nit突变株能自身互补,相同表型的突变株不能互补(见图1B),其中来自于杉木的3个分离物的互补测试结果表明,CC1和CC2两个分离物是亲和的,即这两个分离物的不同表型的Nit突变株能够遗传互补,可归属于一个营养体亲和群(VCG),而CC3属于另一个亲和群,并且是自身不亲和的。此外,来自大叶黄杨上的5个分离物都不能相互互补,属于不同的VCG群。

2.4 讨论

本文将分离自不同寄主的胶孢炭疽菌接种到含氯酸钾的平板上,像*Colletotrichum* spp.等丝状真菌一样,能获得不利用硝酸盐的突变株^[2,8],但是不同分离物的突变频率却出现了极大的差异,这可能与分离物对氯酸钾的抗性有关,如*C. golesporioides*(寄主*Stylosanthes*) 在含15g/L⁻¹氯酸钾的平板上就没能得到突变体^[8],而对氯酸钾抗性较大的CL6分离物的突变频率明显随氯酸钾的浓度的增加而升高(表2)。然而每个分离物产生Nit突变体的表型种类具有较大的差异,虽然出现3种突变表型,但出现nit1表型的频率最高,即硝酸还原酶的结构位点最容易发生突变,其次是nit3表型,nitM表型出现的频率最低。这与*Fusarium*、*Aspergillus*的情况相似^[2],而在*N. crass*和*Colletotrichum* spp.等真菌中还可得到nit2表型^[2,8]。此外,诱导培养基中不同的pH值也会影响突变频率(数据未列出)。不管怎样,胶孢炭疽菌与其它丝状真菌一样其硝酸盐的同化代谢途径是相似的,这种筛选方法也可适用于其它丝状真菌。

将供试分离物的不同表型的Nit突变株在平板上配对培养进行遗传互补测试,能通过异核体的形成来了解分离物之间的遗传关系,即亲和互补说明这些分离物之间能交换遗传信息,如致病力等,这样能遗传互补的分离物被称作一个营养体亲和群(VCG)。本文的结果显示,3个供试的杉木分离物能区别为两个VCG群,即CC1和CC2属于同一个VCG群,CC3属

于另一个群,并且CC3还是自身不亲和的,这在其它丝状真菌如*Fusarium*、*Aspergillus*等^[2]中也存在。Correll(1989)^[9]认为在*F. moniliforme*中是特定遗传位点突变所致。分离自大叶黄杨的分离物都属于不同的VCG群,而且来自于两种寄主的分离物不能互补,应分属于不同的VCG群,因大叶黄杨炭疽菌与杉木炭疽菌在形态上具有一些差异,有人将其归属于*C. greuseum*(王晓鸣,1985,硕士论文西北农业大学)。在一定意义上讲,来自于两个寄主的分离物的遗传不亲和性是所期望的。

提高突变频率和表型的种类在分析炭疽菌群体及其遗传相关性方面尤为必要,增加氯酸钾的浓度和换用不同的氮源在一定程度上能解决这个问题。但似乎对不同的分离物来讲,最佳的诱变条件都不同,这与在*Aspergillus*中得到结果相似^[10],看来对每一种真菌甚至同种不同的分离物都应该优化诱变条件,以期得到较好的结果。

根据本文研究和其它病原真菌的类似研究结果,采用不利用硝酸盐的突变株作遗传标记,通过不同表型的互补测试分析研究炭疽菌群体结构和菌株间的遗传相关性是可行的;并且也可以用于遗传互补法筛选硝酸还原酶基因,构建同源转化质粒和建立高效的转化系统。

参 考 文 献

- [1] Lianage H D, McMillan Jr R T, Kistler H C. *Phytopathol*, 1992, 82:1371~1376.
- [2] Leslie J F. *Ann Rev Phytopathol*. 1993, 31:127~150.
- [3] Unkles S E, Campbell E I, de Ruiter-Jacobs Y M J, et al. *Mol Gen Genet*, 1989, 218:99~104.
- [4] Correll J C, Klittich C J R, Leslie J F. *Phytopathol*, 1987, 77:1640~1646.
- [5] Katan T, Kantan J. *Phytopathol*, 1988, 78:852~885.
- [6] 桑华春,邱德勋. *四川农业大学学报*, 1992, 10: 186~190.
- [7] Puhalla J E. *Can J. Bot*. 1985, 63:179~183.
- [8] Brooker N I, Leslie J F, Dickman B M. *Phytopathol*, 1991, 81:672~677.
- [9] Correll J C, Klittich J R, Leslie J F. *Mycol. Res*, 1989, 93:396~400.
- [10] Bayman P, Cotry P J. *Mycologia*, 1991, 83:311~316.