

齐中强, 杜艳, 刘永锋. Rho型GTPase激活蛋白MoBem2在稻瘟病菌分生孢子形态建成中的功能[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5):1001-1005.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.009

## Rho型GTPase激活蛋白MoBem2在稻瘟病菌分生孢子形态建成中的功能

齐中强, 杜艳, 刘永锋

(江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏南京 210014)

**摘要:** 为了研究Rho型GTPase激活蛋白编码基因*MoBEM2*(MGG\_09303)在稻瘟病菌致病过程中的作用,利用基因敲除方法进行了缺失突变。结果显示该基因缺失突变体产孢量显著下降40%左右,利用荧光增白剂(CFW)染色发现孢子形状变得畸形,形成单个隔膜孢子,约为40%左右,而野生型超过90%均为正常孢子;另外,该基因的缺失导致突变体在培养8h时附着胞形成率显著下降,随着时间的延长,突变体附着胞形成率逐渐上升到野生型程度。可见,MoBem2蛋白调控稻瘟病菌分生孢子的形态建成,延缓分生孢子萌发过程中附着胞的形成,但对稻瘟病菌的致病性没有影响。

**关键词:** 稻瘟病菌; MoBem2; 分生孢子

**中图分类号:** S435.111.4<sup>+</sup>1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)05-1001-05

## Role of Rho GTPase-activated protein MoBem2 in conidium morphogenesis of *Magnaporthe oryzae*

QI Zhong-qiang, DU Yan, LIU Yong-feng

(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To study the function of Rho GTPase activated protein coding gene *MoBEM2* (MGG\_09303) in conidium morphogenesis, the deletion mutant was identified using the knock-out method in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. The deletion mutant produced less conidia (reduced by 40%), and staining by calcofluor white (CFW) showed that forty percent of the conidia were uniseptate in contrast to ninety percent normal three-celled conidia of wild type. The appressorium formation was slowed down significantly at 8 h, but was restored over time. It is indicated MoBem2 is involved in conidium morphogenesis and appressorium formation.

**Key words:** *Magnaporthe oryzae*; MoBem2; conidium

稻瘟病已经成为危害世界粮食安全生产的一种重要病害<sup>[1-4]</sup>。由于经济重要性和遗传转化的易操作

性以及全序列的公布,稻瘟病菌-植物互作模式已经成为研究的热点课题<sup>[5]</sup>。稻瘟病菌分生孢子在其感染水稻的过程中扮演着重要角色<sup>[6]</sup>。分生孢子首先在其顶端产生粘性物质,随后便萌发产生芽管,最后分化形成附着胞。附着胞的分化主要受细胞周期和程序性死亡等因素调控。附着胞内部通过甘油的积累可以产生大约8 MPa的膨压,从而产生侵入钉,突破寄主表皮进入细胞内。侵入后,侵入钉会分化成侵染菌丝,进而在植物细胞内定殖,随着时间的延长,就

收稿日期:2015-07-20

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31401697);江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(15)1054]

作者简介:齐中强(1985-),男,河南驻马店人,博士,助理研究员,主要从事稻瘟病菌功能基因研究。(Tel)025-84391810;(E-mail)qizhongqiang2015@jaas.ac.cn

通讯作者:刘永锋,(Tel)025-84390180;(E-mail)liuyf@jaas.ac.cn

会形成可见的典型稻瘟病斑。当外界条件(温度、湿度)适宜时,病组织上会重新长出孢子梗,进而产生分生孢子,继续进行再侵染<sup>[7]</sup>。Rho 蛋白是 Ras 超家族中最早被克隆出来的一类蛋白质,它们是一组相对分子质量约为  $2.0 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^4$  的三磷酸鸟苷结合蛋白,具有 GTP 酶活性,主要调控细胞骨架的形成及细胞形态建成<sup>[8]</sup>。Rho 蛋白和其他类型的 G 蛋白具有相似的功能,作为一种分子开关,具有 GTP 结合的活性状态和 GDP 结合的失活状态。激活蛋白 Bem2 主要行使 GTPase 激活功能,促使 GTP 向 GDP 的转换,加速 Rho 蛋白的失活。为了明确 Rho 蛋白 GTPase 激活蛋白在稻瘟病菌中的功能,本研究通过基因敲除的方法,对稻瘟病菌中 Rho 型 GTPase 激活蛋白 MoBem2 功能进行解析。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) Guy11 和水稻品种 CO39(感病品种)由南京农业大学植物保护学院真菌与卵菌实验室提供。完全培养基 CM、产孢培养基 SDC 的配制方法参照文献<sup>[9]</sup>。

### 1.2 试验方法

1.2.1 敲除载体构建及稻瘟病菌敲除转化 通过稻瘟病菌全基因组序列公布网站,下载预测到的 *MoBEM2* 基因序列。将稻瘟病菌基因组数据库中 *MoBEM2* 基因上、下游各 1 kb 左右的 DNA 序列作为同源重组的上、下两臂,构建基因敲除载体。以野生型 Guy11 基因组 DNA 为模板,分别用引物 bem2-p1(F)/bem2-p2(R) 和 bem2-p3(F)/bem2-p4(R) 扩增上、下臂片段,经电泳、切胶回收将 PCR 产物纯化。再以这两臂片段为模板,用引物 bem2-p1(F)/bem2-p4(R) 进行 Over-lap PCR 扩增。PCR 产物切胶回收后连接到 pMD19-T simple vector (TaKaRa, Dalian, China) 得到质粒 pMD::BEM2, 并送交上海 Invitrogen 公司测序,其中引物 bem2-p2 和 bem2-p3 序列中设有 *EcoRV* 酶切位点。以质粒 pCB1003 为模板,用引物 FL1111(F)/FL1112(R) 高保真 PCR 扩增抗性筛选基因—潮霉素磷酸转移酶基因 (*HPH*),所用的高保真酶为 Primer STAR (TaKaRa, Dalian, China),反应程序为:98 °C 10 s,56 °C 15 s,72 °C 1 min,30 个循环。扩增得到的平末端 PCR 产物切胶回收后插入 *EcoRV* 酶切过的质粒 pMD::

*BEM2* 中,得到敲除载体 pMD::BEM2::HPH。以该质粒为模板,用引物 bem2-p1(F)/bem2-p4(R) 扩增得到约 3.4 kb 的敲除片段用于稻瘟病菌的原生质体转化,原生质体转化方法参照文献<sup>[10]</sup>。

1.2.2 转化子验证及 Southern 杂交 提取转化得到的转化子基因组 DNA (CTAB 法),用引物 bem2-p5(F)/bem2-p6(R) 进行验证,随后将验证得到的候选突变体进行 Southern 杂交。以稻瘟病菌野生型 Guy11 基因组 DNA 为模板,用引物 bem2-p5(F)/bem2-p6(R) 扩增出 *MoBEM2* 基因内部 889 bp 片段,以此片段作为探针,并用地高辛标记。Guy11 菌丝基因组 DNA 经 *EcoRI* 酶切于 1.0% 琼脂糖凝胶中过夜电泳,充分分离酶解片段,然后转移至带正电的尼龙膜 (HybondTM-N<sup>+</sup>, Amersham, Biosciences UK Limited) 上,与地高辛标记的探针于 58 °C 杂交过夜。Southern 杂交过程参照 Digoxigenin high-prime DNA labeling and the detection starter kit 1 (Roche, Germany) 的操作手册。以上引物序列见表 1。

1.2.3 分生孢子的诱导产生 将野生型 Guy11 及敲除突变体接种在 SDC 培养基上,28 °C 黑暗培养 7 d 左右,待菌丝体长满平板后,用手术刀将表面气生菌丝刮掉,于黑光灯下照射 3 d,诱导分生孢子产生。收集孢子时,向培养基内加入 3 ml 无菌水,轻轻用 1.5 ml EP 管底部将表面气生菌丝和孢子刷下,再经过 4 层擦镜纸过滤收集孢子。

1.2.4 附着胞形成的观测 将盖玻片 (Fisherbrand, 12-540-A 18×18-2) 放置在载玻片上(下面滴加无菌水),取 40 μl 浓度为 1 ml  $5 \times 10^4$  个的分生孢子液,滴加于盖玻片中央,随后将载玻片放入培养皿中 28 °C 黑暗保湿培养 2 h、4 h、6 h、8 h、24 h 和 48 h 后分别制片观测附着胞形成率。设置 3 个重复。

1.2.5 水稻喷雾接种及大麦离体致病性测定 将刷下的分生孢子液浓度调至 1 ml  $5 \times 10^4$  个,加入 0.25% 明胶,喷雾接种生长 14 d 的水稻,28 °C 黑暗培养 24 h,随后 16 h 光照,8 h 黑暗,处理期间需要保持高温高湿状态。接种 5~7 d 后,观察结果。大麦离体致病性测定:剪取生长 14 d 的大麦叶片铺于含有保湿滤纸的培养皿中,将孢子液浓度调至 1 ml  $5 \times 10^4$  个,加入 0.25% 明胶,每片叶片滴 3 滴孢子液,以清水做对照,置于 28 °C 黑暗培养 24 h,随后 16 h 光照,8 h 黑暗处理。接种 5~7 d 后,观察结果。试验重复 3 次。

表 1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列
bem2-p1 (F)	5'- GCCTGTGTGCGTGCATTCCATCT-3'
bem2-p2 (R)	5'- GATGGGACCAGAAAACAGTAGATATCCGTGGCCTTTGGAGTTGAGG-3'
bem2-p3 (F)	5'-CCTCAACTCCA AAGGCCACGGATATCTACTGTTTTCTGGTCCCATC-3'
bem2-p4 (R)	5'- ATCGTGTCCATGCCTACTGCTGTTG-3'
bem2-p5 (F)	5'- ATGGGACGCAAACCTGCACCTCA-3'
bem2-p6 (R)	5'- TGTGATCTTGAGCGACCGAGCAG-3'
FL1111	5'-GGAGGTCAACACATCAATG-3'
FL1112	5'-CTCTATTTCCTTTGCCCTCG-3'

1.2.6 水稻叶鞘侵染 取生长 28 d 的水稻植株,剥去外面叶片,留存倒数第 2 片叶鞘和新叶,将新叶慢慢取出,保留叶鞘部分。收集野生型和突变体分生孢子,调配孢子液浓度为 1 ml  $1 \times 10^5$  个,用 1 ml 注射器将孢子液注入叶鞘内,随后放入保湿培养皿中保湿培养,水稻根部覆盖脱脂棉保湿。48 h 后,用手术刀将叶鞘切断,选取距根部较近部位用眼科镊撕取叶鞘内表皮,随后制片观察并拍照。每个菌株处理 10 株水稻叶鞘。

1.2.7 分生孢子荧光增白剂 (CFW) 染色 将 10 mg/ml 的 CFW 染色液稀释 1 000 倍,加入准备好的孢子悬浮液中,避光染色 5 min,随后用无菌水冲洗数次,置于荧光显微镜下观察。

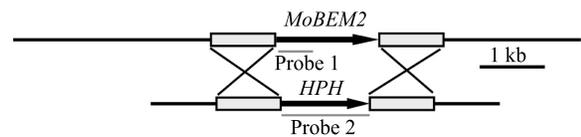
## 2 结果与分析

### 2.1 稻瘟病菌 *MoBEM2* 基因敲除突变体的获得

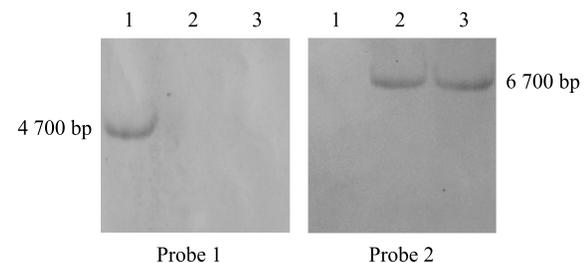
利用同源重组原理对稻瘟病菌中的 *MoBEM2* 基因进行了定向敲除(图 1),经初步验证获得 #23 和 #32 2 个转化子。Southern 杂交结果(图 2)显示,两个突变体用基因探针没有杂交出 4.7 Kb 条带,说明已被成功敲除,进一步用潮霉素探针杂交出了约 6.7 Kb 条带,证明 *MoBEM2* 基因已被潮霉素基因成功替换。

### 2.2 *MoBEM2* 基因敲除突变体的孢子形态

将稻瘟病菌野生型 Guy11 和 #23 突变体及互补转化子分别接种到 SDC 培养基中,随后诱导产孢。发现突变体分生孢子产量显著降低(下降 40% 左右)(图 3),孢子形态发生改变(图 4),分生孢子只形成一个隔膜(约占 40% 左右),而野生型中超过



Probe1: 基因内部探针; Probe 2: 潮霉素探针。

图 1 *MoBEM2* 基因替换策略简图Fig. 1 Schematic illustration of *MoBEM2* targeted gene replacement

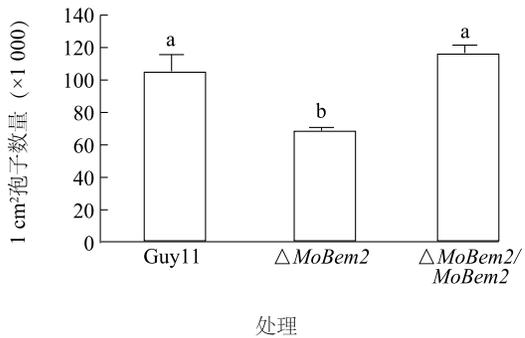
Probe1: 基因内部探针; Probe 2: 潮霉素探针。1: 野生型菌株 Guy11 基因组 (*EcoR* I 酶切); 2: 敲除突变体  $\Delta$ *Mobem2* #23 基因组 (*EcoR* I 酶切); 3: 敲除突变体  $\Delta$ *Mobem2* #32 基因组 (*EcoR* I 酶切)。

图 2 *MoBEM2* 敲除突变体 Southern 杂交验证Fig. 2 Southern blot of *MoBEM2* deletion mutant

90% 均为正常孢子(图 5),说明 *MoBem2* 参与了稻瘟病菌分生孢子的形态建成。

### 2.3 *MoBEM2* 基因敲除突变体附着胞的形成率

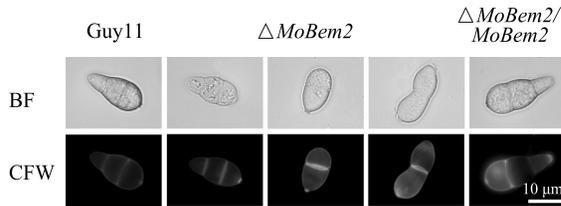
稻瘟病菌附着胞的形成对其致病性是必须的<sup>[11]</sup>,因此检测了 *MoBEM2* 敲除突变体附着胞形成情况。结果(图 6)表明,突变体分生孢子在培养 8 h 时附着胞形成率显著低于野生型和互补转化子,但



Guy11: 野生型菌株;  $\Delta$ Mobem2: 敲除突变体;  $\Delta$ Mobem2/MoBEM2: 互补转化子。不同字母(a, b)代表差异达 0.05 显著水平。

图3 MoBEM2 敲除突变体分生孢子产量

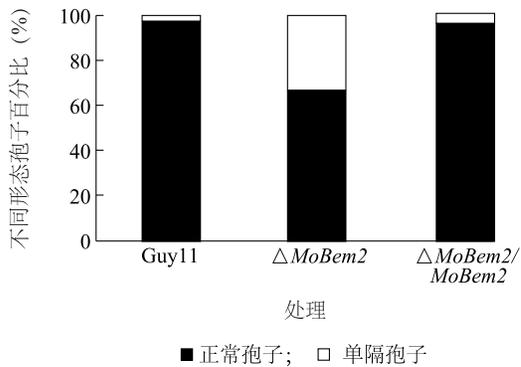
Fig. 3 Conidial production of MoBEM2 deletion mutant



BF: 明场; CFW: 荧光增白剂染色。Guy11: 野生型菌株;  $\Delta$ Mobem2: 敲除突变体;  $\Delta$ Mobem2/MoBEM2: 互补转化子。

图4 MoBEM2 敲除突变体分生孢子形态

Fig. 4 Conidial morphology of MoBEM2 deletion mutant

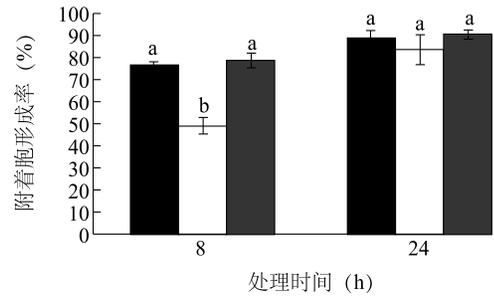


Guy11: 野生型菌株;  $\Delta$ Mobem2: 敲除突变体;  $\Delta$ Mobem2/MoBEM2: 互补转化子。

图5 MoBEM2 敲除突变体不同形态分生孢子百分比

Fig. 5 Percentage of uniseptate and normal conidial morphology of MoBEM2 deletion mutant

随着时间延长,该缺陷恢复,至 24 h,突变体附着胞形成率与野生型没有差异。说明 MoBEM2 基因敲除延缓了稻瘟病菌附着胞的形成。



■ 野生型菌株Guy11; □ 敲除突变体 $\Delta$ MoBem2; ■ 互补转化子 $\Delta$ MoBem2/MoBem2

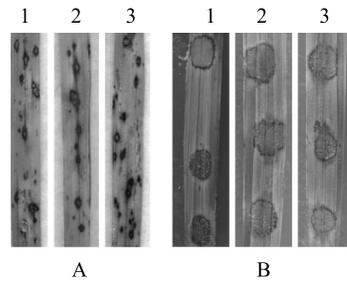
不同字母表示同一处理时间内差异达 0.05 显著水平。

图6 MoBEM2 突变体附着胞形成率

Fig. 6 Appressorium formation rate of MoBEM2 deletion mutant

### 2.4 MoBEM2 基因敲除突变体的致病性

将野生型、敲除突变体和互补转化子的分生孢子配制成浓度为 1 ml  $5.0 \times 10^4$  个的孢子悬浮液(含 0.25% 明胶),分别采用水稻植株喷雾和大麦离体叶片点滴的方法进行致病性测定。结果显示,在两种接种条件下,敲除突变体发病情况与野生型、互补转化子均无差异,表明 MoBEM2 基因在稻瘟病菌致病过程中不起作用(图 7)。



A: 喷雾测定; B: 离体叶片测定。1: 野生型菌株 Guy11; 2: 敲除突变体  $\Delta$ Mobem2; 3: 互补转化子  $\Delta$ Mobem2/MoBEM2。

图7 MoBEM2 敲除突变体对水稻和大麦的致病性

Fig. 7 Pathogenicity to rice (A) and barley (B) of MoBEM2 deletion mutant

## 3 讨论

Rho 型蛋白通过与特异性的鸟嘌呤核苷酸转换因子(GEF)结合而被激活,与 GTP 酶激活蛋白(GAPs)结合而失活<sup>[12]</sup>。本试验以稻瘟病菌中一个 Rho 型蛋白 GTP 酶激活蛋白 MoBem2 为研究对象,

通过基因敲除,发现 MoBem2 参与稻瘟病菌分生孢子的形态建成,延缓附着胞的形成。

分生孢子在稻瘟病菌的致病过程中具有重要作用<sup>[13]</sup>。稻瘟病菌中,MoRac1 主要参与稻瘟病菌分生孢子的形成以及形态建成,并且调控稻瘟病菌对水稻的致病力<sup>[14]</sup>。本研究中,敲除 Rho 型 GTP 酶激活蛋白编码基因 *MoBEM2* 后,该突变体出现单隔的分生孢子,分生孢子产量也显著下降,推测该基因参与分生孢子的形成及形态建成。上述结果表明 Rho 蛋白主要通过其激活和失活调控稻瘟病菌分生孢子的形态建成,在这个过程中,GTP 酶的作用尤为明显。此外,*MoHOX2* 作为 Homeobox 转录因子家族的成员,敲除后稻瘟病菌丧失产孢能力<sup>[15]</sup>。2 个 SNARE 蛋白 MoVam7<sup>[16]</sup> 和 MoSec22<sup>[17]</sup> 同样参与了稻瘟病菌的产孢过程,两者的敲除突变体均丧失产孢能力。说明了稻瘟病菌分生孢子的调控涉及多种机制。

附着胞在稻瘟病菌侵染过程中起着至关重要的作用<sup>[18]</sup>。*MoBEM2* 敲除突变体分生孢子在诱导界面上能够形成附着胞,但在附着胞形成早期,突变体附着胞形成率显著降低,但在后期与野生型没有差别。说明该基因一定程度上影响稻瘟病菌附着胞早期的形成,但不影响稻瘟病菌的致病性。综上所述,MoBem2 参与了稻瘟病菌分生孢子的形成及形态建成过程,这对认识稻瘟病菌致病过程有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] WILSON R A, TALBOT N J. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae* [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7: 185-195.
- [2] 于涛,张海楼,隗英华,等. 施肥模式对水稻稻瘟病抗性的影响[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(7): 113-116.
- [3] 张晓娟,张羽,张辰露,等. 分子标记在稻瘟病抗性育种中应用的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(8): 73-75.
- [4] 唐成,陈露,安敏敏,等. 稻瘟病诱导水稻幼苗叶片氧化还原系统的特征谱变化[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(12): 141-144.
- [5] DEAN R A, TALBOT N J, EBBOLE D J, et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* [J]. *Nature*, 2005, 434: 980-986.
- [6] HAMER J E, HOWARD R J, CHUMLEY F G, et al. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus [J]. *Science*, 1988, 239, 288-290.
- [7] TALBOT N J. On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea* [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2003, 57: 177-202.
- [8] JOHNSON D I. Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, 63: 54-105.
- [9] ZHANG H, TANG W, LIU K, et al. Eight RGS and RGS-like proteins orchestrate growth, differentiation, and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* [J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7: e1002450.
- [10] QI Z, WANG Q, DOU X, et al. MoSwi6, an APSES family transcription factor, interacts with MoMps1 and is required for hyphal and conidial morphogenesis, appressorial function and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13: 677-689.
- [11] THINES E, WEBER R W, TALBOT N J. MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea* [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 1703-1718.
- [12] JAFFE A B, HALL A. Rho GTPases: biochemistry and biology [J]. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21: 247-269.
- [13] TALBOT N J, EBBOLE D J, HAMER J E. Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* [J]. *The Plant cell*, 1993, 5: 1575-1590.
- [14] CHEN J, ZHENG W, ZHENG S, et al. Rac1 is required for pathogenicity and Chml-dependent conidiogenesis in rice fungal pathogen *Magnaporthe grisea* [J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4: e1000202.
- [15] KIM S, PARK S Y, KIM K S, et al. Homeobox transcription factors are required for conidiation and appressorium development in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5: e1000757.
- [16] DOU X, WANG Q, QI Z, et al. MoVam7, a conserved SNARE involved in vacuole assembly, is required for growth, endocytosis, ROS accumulation, and pathogenesis of *Magnaporthe oryzae* [J]. *Plos One*, 2011, 6: e16439.
- [17] SONG W W, DOU X Y, QI Z Q, et al. R-SNARE homolog moSec22 is required for conidiogenesis, cell wall integrity, and pathogenesis of *Magnaporthe oryzae* [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e13193.
- [18] JEON J, GOH J, YOO S, et al. A putative MAP kinase kinase, MCK1, is required for cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2008, 21, 525-534.

(责任编辑:张震林)