

稻熱病菌的染色體數目¹

吳信淦² 宋淑蓮²

(Received March 21, 1984; Accepted June 20, 1984)

摘 要

稻熱病菌染色體的數目前人大致同意為六，雖也有為二至五、三或六的報導。本文使用乳酸—Orcein 染色，觀察稻熱病菌小種與從 *Eleusine coracana*、*Eragrostis curvula* 等寄主分離的菌株雜交所得個體的染色體。在粗絲期及現叉期均見到九條二價染色體，減數第一分裂中期及後期各別見到八個二價染色體及十六個單價染色體，即使在子囊孢子有絲分裂中期及後期也都得到染色體數為九的證據。

從上述計數推論由不同寄主分離的菌株，其染色體數目相同，但從減數分裂現叉期一條二價染色體由二形態不同的同源染色體構成，末期有染色體橋出現及子囊孢子有不稔性等事實判斷，構成此等菌株染色體組的質有所不同，此可作為此菌屬物種命名的根據之一。作者等建議今後以乳酸—Orcein 取代 鹽酸-Giemsa 作稻熱病菌重要性狀，如病原性、交配型等細胞遺傳的研究。

Key words: *Pyricularia oryzae*; rice blast fungi; chromosome number; meiosis.

一、引 言

稻熱病菌的染色體數目，前人曾用鹽酸—Giemsa 染色法在分生孢子及菌絲細胞核有絲分裂過程中觀察過，大致同意此真菌體細胞有六條染色體 (Giatgong 及 Frederiksen, 1969; Yaegashi 及 Hebert, 1976a)。Kameswar Row, Gunawardeua 及 Crill (1980) 對稻熱病菌體細胞繁殖時細胞核的行為有詳盡的觀察，但未確定核內染色體的數目。自從 Hebert (1971) 在 *Pyricularia* 屬的 *grisea* 成功地誘發有性世代之後，Yaegashi 及 Hebert (1976a) 在 *grisea* 系統間雜種個體子囊孢子第一次有絲分裂中期看到六條染色體，同分裂後期有十二條染色體。Tanaka, Murata 及 kato (1979) 在稻熱病菌系統與同屬另一物種雜交所得幼小子囊減數第一分裂中期看到六個二價染色體。

雖則如此，稍早 Suzuki (1965) 曾稱稻熱病菌的染色體數為二至五個不定。Yamasaki 及 Niizeki (1965) 稱稻熱病菌的染色體數在有些核中為六，有些核中則為三。稻熱病菌體細胞染色體的製作確實頗為困難，本實驗室十多年前嚐試過，未曾成功。即使以電子顯微鏡觀察分裂中的核也未曾見到個別的染色體。Barry (1969) 用乳酸—Orcein 染色方法曾把麵包霉菌 (*Neurospora crassa*) 有性世代的粗絲期染色體製作得相當清晰。由於前人均用鹽酸—Giemsa 染稻熱病菌的染色體，乳酸—Orcein 似也值得一試。再者、近年來 *Pyricularia* 屬種間雜交 (Tanaka *et al.* 1979) 及稻熱病菌系統間雜交 (Kato 及 Yamaguchi, 1982) 的成功提供了難得的進一步研究的

¹ 中央研究院植物研究所研究報告編號 281。

² 中央研究院植物研究所研究員及研究助理。

基礎。本文報導用乳酸—Orcein 染色法觀察 *Pyricularia* 屬種間雜種個體的染色體並顯示其染色體數目為九。

二、材料與方法

(一)真菌系統：本地分離的稻熱病菌小種，IF-4、IG-2、IH-1 及 II-1、均設其交配型為 A 者。由 Kato 寄贈的四個系統，IN77-24-1-1、MZ11-3-2、KUR1-2 及 G10-1。均已知屬交配型 A 者。由 Yaegashi 寄贈的一個系統，Ken-82-13 已知屬交配型 a 者。Kato 的菌系從 *Eleusine coracana* 分離，Yaegashi 的則從 *Eragrostis curvula* 分離。

(二)雜交與子實體形成的誘發：將交配型為 A 的諸系統各別與交配型為 a 的雜交。雜交在修飾的燕麥培養基 (Kato 個人通訊) 上進行，係將交配型為 A 及 a 者的菌絲接種於 9 cm 培養皿培養基表面的對角交錯位置，各兩接點。培養於 28°C 溫箱內，待四菌落邊緣行將接觸之前，移培養皿於 20°C，照以波長為 400 nm 左右的光；晝夜各為 12 小時 (Yaegashi 及 Hebert, 1976b)。

(三)固定液與染色劑：固定液為六份無水酒精，一份冰醋酸及一份 85% 乳酸。染色劑的配製如下：將 Orcein 100 mg 投入 5 ml 染色原液 (47 ml 冰醋酸，20 ml 3.5% 乳酸、5 ml 1N 鹽酸及 28 ml 蒸餾水) 內煮沸，迴餾 4 分鐘，冷卻後過濾備用 (Barry, 1969)。

(四)染色體製作：取幼小子實體 (其內子囊正開始行減數分裂者)，以固定液固定，抽氣過夜。染色體製作用塗抹法，其要點與稻粗絲期染色體製作 (吳、1967) 的相同，即：1. 將正行減數分裂的細胞散出 2. 加熱使染色體過份染色 3. 以染色原液清洗蓋玻片下染劑，使細胞質色淡而增加染色體的清晰度。

(五)照相：Olympus BH-2 顯微鏡，Splan $\times 100$ 油鏡；Wild MPS15 測光；柯達 2415 底片 (定 ASA 為 100)；柯達 HC110 顯影液 1: 5、20°C、4 分鐘。

三、結 果

本地四個生理小種及 Kato 的四個系統均能與 Yaegashi 的 Ken-82-13 雜交成功，產生子實體，子實體圓形，上方長有分枝狀的鳥喙 (圖 1 及 2)，以前一羣所得雜種的稔實率較以後一羣所得的為低。由於前者與 Ken-82-13 雜交成功可確定稻熱病菌四個小種的交配型為 A。鉤形細胞具二元核，經減數分裂形成四個核 (圖 3-5)，再各經一次有絲分裂，形成具八個核的幼小子囊 (圖 14)。待此八核各圍以細胞壁後 (圖 6) 再經二次有絲分裂，形成八個各具四個細胞的子囊孢子。子囊孢子形成的步驟雖相同，同一子囊內子囊孢子的發育有在中途受阻者，因此有些子囊中只有機會形成兩個子囊孢子 (圖 16)。

正進行減數分裂的子囊都較幼小，細胞質較濃厚，同一子實體內各子囊的發育有很大的差別 (圖 7)。較粗絲期為早或為早粗絲期的染色體細長而紊亂，不易辨認、計數 (圖 8)。於粗絲期常見九條二價染色體成線條狀。以長短順序排列，第一、二兩條各長約 9μ ，第三、四兩條各長約 6.5μ ，第五至七條各長約 5μ ，第八條長約 2.5μ ，第九條長約 1.2μ 。中節尚難以區分，也未見核仁 (圖 9 A, B)。

現父期的染色體縮短逾半，因同源染色體開始分離而顯示交叉點。圖 11 所示為一核的九條二價染色體；11 B 的五條二價染色體中有二條的同源染色體已經分開，祇藉交叉點相連接，且其中之一的兩同源染色體的長短有別；11 A 的四條二價染色體因製片時加熱加壓而與圖 11 B 同核

的五條沖散，其同源染色體似均尚未有明顯分開。

減數第一分裂中期細胞內，至少可見八個二價染色體，已緊縮成點狀（圖12）。由不同焦距的A及B兩圖分析可知，其中央有兩個二價染色體重疊。很可能，另一個二價染色體也在此重疊成堆，因其太小而不易辨認。

減數第一分裂後期，每個二價染色體的兩同源染色體分離，趨向兩極。圖13所示的第一分裂後期有十六個單價染色體，與期望的十八個相較短缺兩個。此可能為最小的單價染色體與別的重疊未能計數到，也可能在此較後的後期尚有兩個較小的二價染色體尚未分離。

減數第一分裂末期，染色體已趨向兩極，但顯然有染色體橋存在（圖10）。多數情況下、經減數分裂所得的八核期子囊，迅即在每一核外圍以細胞壁，形成八個將來發育成子囊孢子的細胞。但若干八核期子囊的核在圍以細胞壁之前或同時，行子囊孢子的第一次有絲分裂，於此分裂中期可見九個染色體（圖14）。

子囊孢子行第二次有絲分裂的結果，得一由四相連細胞構成的子囊孢子；同一子囊內各孢子第二次有絲分裂的開始各有遲早。圖15所記，其一子囊孢子正達第二次有絲分裂的中後期、可見六個染色體及六個已經分開的染色體，也即單元細胞的染色體數為九。

四、討 論

前人觀察 *Pyricularia* 屬若干物種，包括稻熱病菌 (*P. oryzae*) 染色體的數目均用鹽酸—Giemsa 染色，其所報導的數目大致為六，也有二至五、三或六的（文獻見引言）。此等不一致的原因，正如 Yaegashi *et al.* (1976 a) 指出，此菌屬染色體數目的觀察受染色步驟的影響很大，尤其是褪色不當時為甚。作者等在電子顯微鏡下觀察稻熱病菌分生孢子及菌絲細胞的核分裂，從未見到核內有個別的染色體，但見核仁並在有絲分裂過程中核膜漸次破裂，核質因此與核外圍的粒線體等相混。此種破裂、相混的結果可能也是染色體數目不一致的原因之一。再者，染色體的相互聚集、不散開也會影響觀察結果，如圖3為減數第一分裂中間，染色體數似可讀為三，但如與圖12、圖13的作大小的比較，顯然是由於較小的染色體聚集成較大的三團所致。

使用乳酸—Orcein 染 *Pyricularia* 屬種間雜種個體減數分裂的染色體，得到預期的效果。尤其是使用過份染色及染色分化的原則，使染色體較 Barry (1969) 的更為清晰地出現在淺色的核質中。減數分裂粗絲期（圖9），現叉期（圖11）均顯示九條二價染色體、故可相信此菌單元的染色體數為九。中期（圖12）見到的八個二價染色體證實其單元的染色體數多於過去所報導的六（Giatgong *et al.*, 1969; Yaegashi *et al.*, 1976a; Tanaka *et al.*, 1979; Kameswar Row *et al.* 1980)。如果此菌的單元細胞確祇有六個染色體，則於早後期不可能有十六個（圖13）而應是十二個單價染色體。子囊孢子第一有絲分裂的九個染色體（圖14）以及第二有絲分裂中後期的六個染色體加六個染色體（圖15）更給予充份的證據支持稻熱病菌的染色體數為九。

從不同寄主分離的菌株有不同病原性，Yaegashi (1978) 報告此等病原性的遺傳由基因控制，且與控制交配型的基因獨立分離。通常，前人把不同寄主來源的菌株歸為 *Pyricularia* 屬下的不同物種，雖則此等物種的名稱多數尚未給予（Yaegashi 及 Nishihara, 1976; Yaegashi, 1978; Kato 1978）。本文所用材料分別來自 *Oryza sativa*、*Eleusine coracana* 及 *Eragrostis curvula* 等不同寄主，來自前兩者的均能與來自後者的雜交產生子實體、且兩羣雜交組合雜種個體有相同的染色體數，似均屬同一物種。但不同羣雜交組合間，子囊孢子的稔性高低不同，且構成九條染色體的質，從減數分裂現叉期一對同源染色體的長短有別（圖11）及其末期有染色體橋出現（圖10）判斷，

，有所不同，此似可作為此等物種正式命名時的根據之一。

乳酸—Orcein 的染色效果，對 *Pyricularia* 屬種間雜種個體而言，較鹽酸—Giemsa 的為佳；實用上，值得採取以前者取代後者的策略。又乳酸—Orcein 能將減數分裂的染色體染得十分清晰，子囊孢子的兩次有絲分裂的染色體也然，但對分生孢子及菌絲細胞染色體的效果，尙待一試。

稻熱病菌病原性及其他性狀遺傳行為的研究，需要以此菌不同菌株(或系統)間能雜交成功為基礎。Kato *et al.* (1982) 的研究報告，提供了一些基礎。更佳的展望是配合性狀遺傳的研究，以本文所用的方法作染色體的觀察，則定出病原性基因、交配型基因等在此菌九條染色體上的位置似也非為難事。

References

- 吳信淦 1967: 粗絲期染色體製備法。科學農業 15: 1-6.
- Barry, E. G. 1969. The diffuse diplotene stage of meiotic prophase in *Neurospora*. Chromosoma (Berl.) 26: 119-129.
- Giatgong, P. and R. A. Frederiksen. 1969. Pathogenic variability and cytology of monoconidial subcultures of *Pyricularia oryzae*. Phytopathology 59: 1152-1157.
- Hebert, T. T. 1971. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. Phytopathology 61: 83-87.
- Kameswar Row, K. V. S. R., I. Gunawardena, and J. P. Crill. 1980. Nuclear behavior in asexual reproduction and its implications on pathogenic variability of *Pyricularia oryzae*. Saturday Seminar Sept. 6, 1980, pp. 1-11.
- Kato, H. 1978. Biological and genetic aspects in the perfect state of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cav. and its allies. Gamma Field Symposia No. 17 'Mutation Breeding for Disease Resistance, pp. 1-19.
- Kato, H. and T. Yamaguchi. 1982. The perfect state of *Pyricularia oryzae* Cav. from rice plants in culture. Ann. Phytopath. Soc. Japan 48: 607-612.
- Suzuki, H. 1965. Origin of variation in *Pyricularia oryzae*. IRRI (ed.), In The Rice Blast Disease John Hopkins Press, Baltimore, pp. 111-149.
- Tanaka, Y., N. Murata, and H. Kato. 1979. Behavior of nuclei and chromosomes during ascus development in the mating between either rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 45: 182-191.
- Yaegashi, H. 1978. Inheritance of pathogenicity in crosses of *Pyricularia* isolates from weeping lovegrass and finger millet. Ann. Phytopath. Soc. Japan 44: 626-632.
- Yaegashi, H. and T. T. Hebert. 1976a. Perithecial development and nuclear behavior in *Pyricularia*. Phytopathology 66: 122-126.
- Yaegashi, H. and T. T. Hebert. 1976b. Effect of temperature, light and nutrients on production of perithecia by *Pyricularia*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 42: 556-562.
- Yaegashi, H. and N. Nishihara. 1976. Production of the perfect stage in *Pyricularia* from cereals and grasses. Ann. Phytopath. Soc. Japan 42: 511-515.
- Yamasaki, Y. and H. Niizeki. 1965. Studies on variation of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cav. I. Karyological and genetical studies on variation. Bull. Natl. Inst. Agric. Sci. (Japan), Ser. D 13: 231-274.

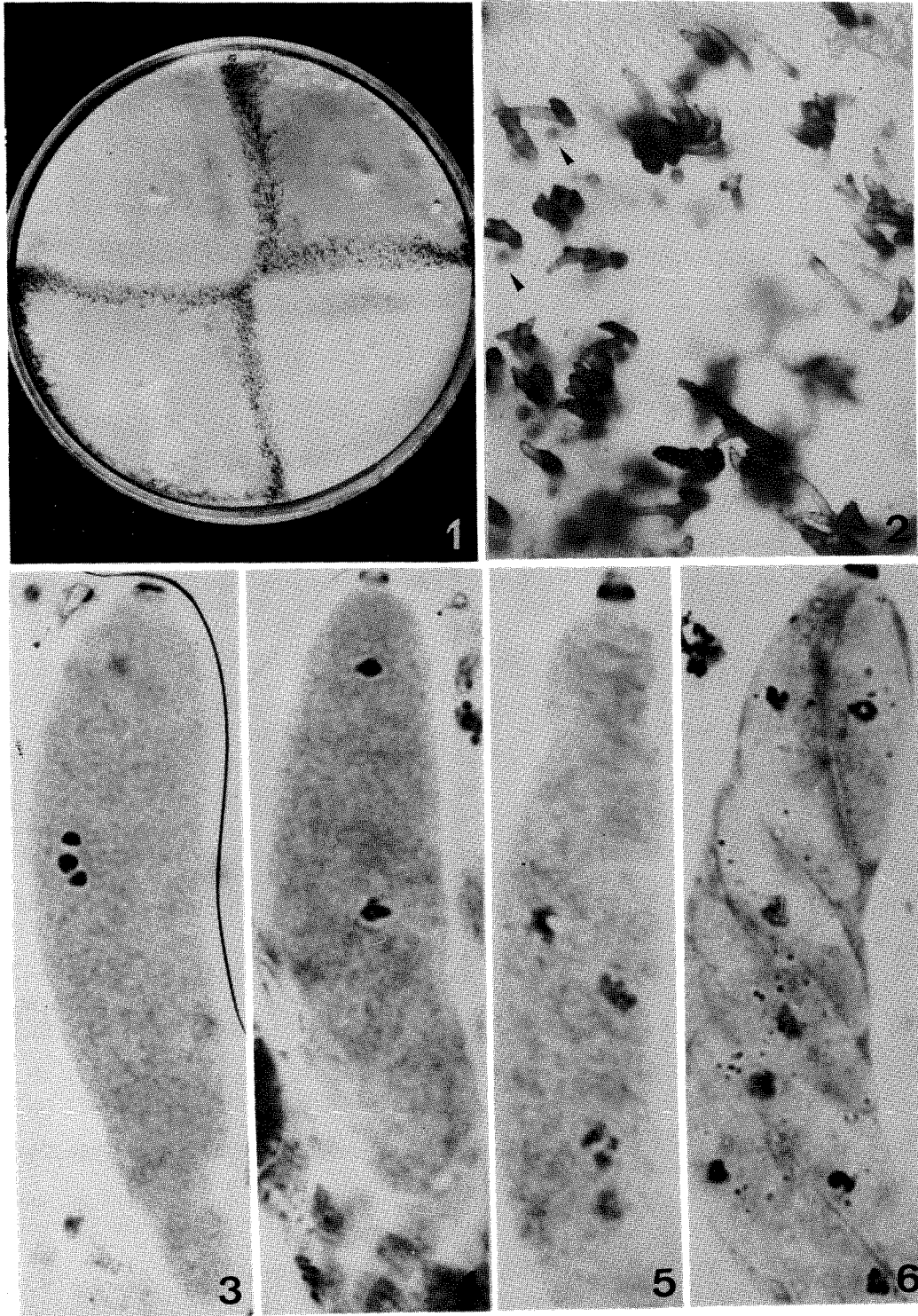
圖 版 說 明

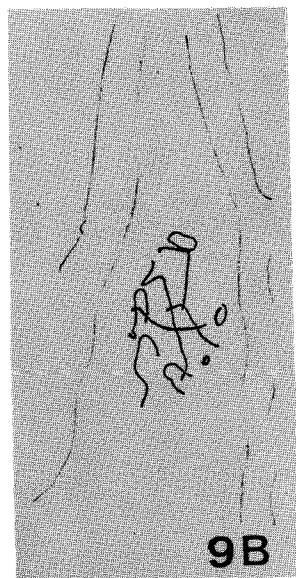
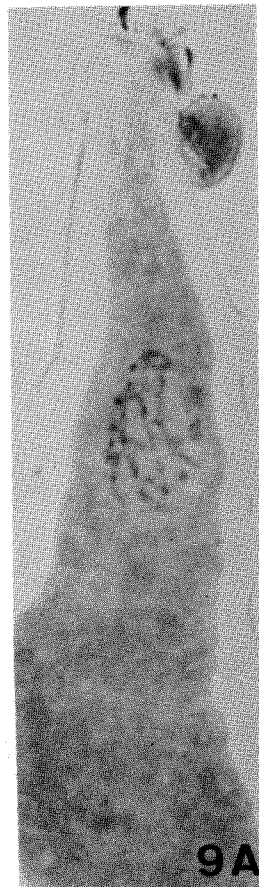
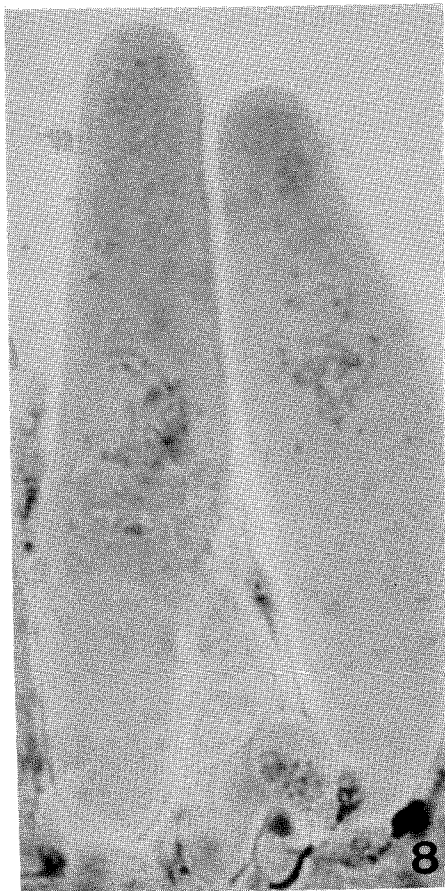
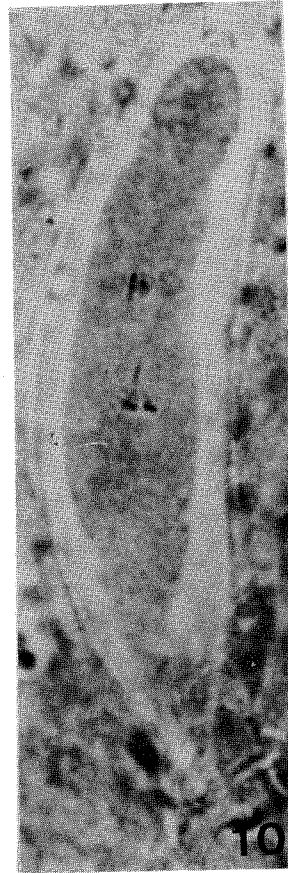
Explanation of Figures

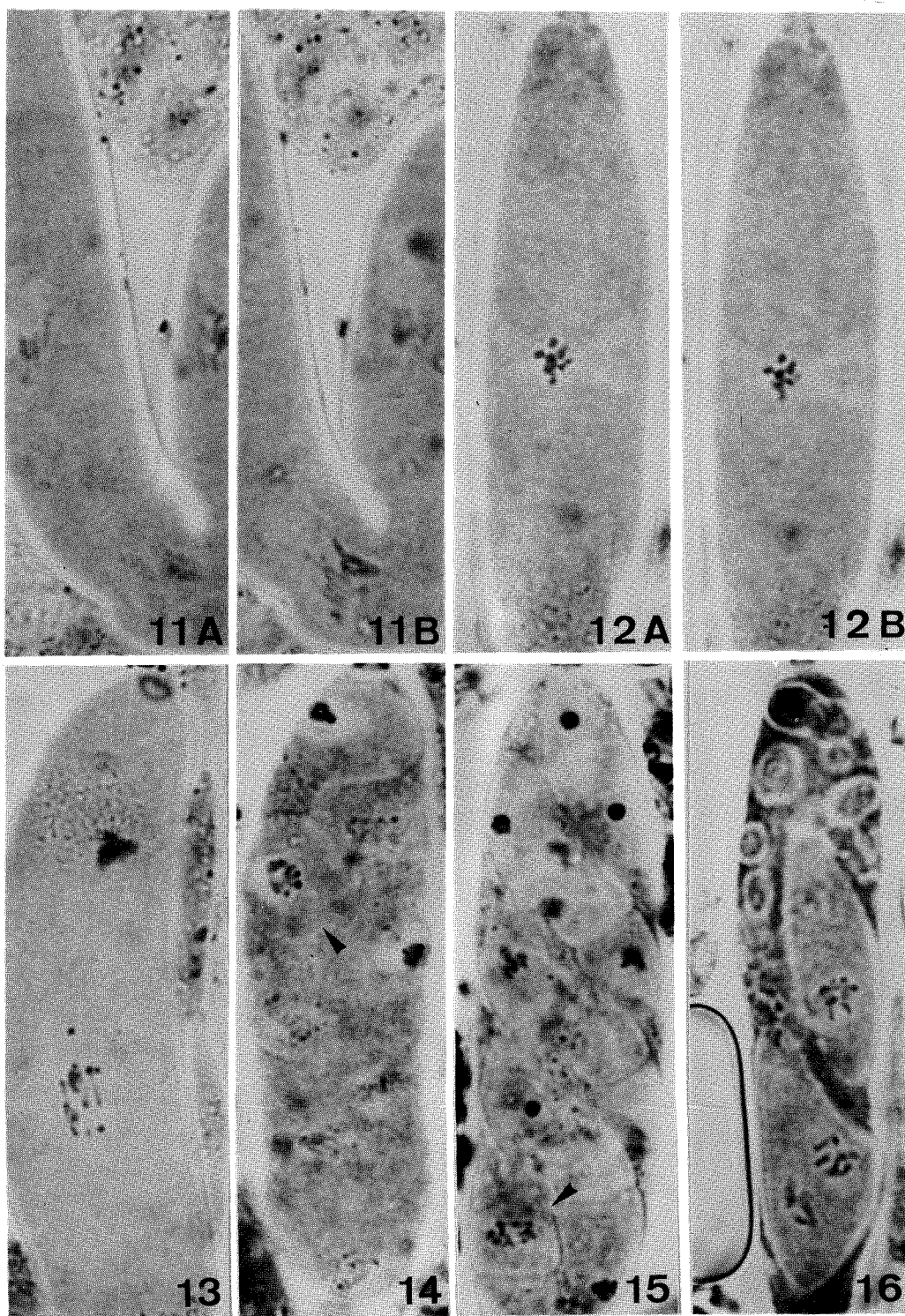
除圖 1 爲 0.8 ×，圖 2 爲 10 ×，圖 7 爲 200 ×，其餘均爲 2,000 ×

All figures are 2,000 × in magnification, except figs. 1, 2 and 7 which are 0.8 ×, 10 × and 200 ×, respectively.

- 圖 1. 雜交的子實體分布於兩親菌落的交界地帶，在培養基表面成十字形。
Fig. 1. Hybrid perithecia growing out at the junction of two parents exhibited as a cross configuration.
- 圖 2. 部分子實體放大，圓形子實體（箭頭）多埋於培養基內，分枝狀鳥喙則伸出於培養基表面。
Fig. 2. Some enlarged perithecia shown in fig. 1, the ball shaped base part (arrow head) of the perithecia but not its branched beak is underneath the agar.
- 圖 3. 4 及 5，順序爲幼小子囊的單核期，二核期及四核期。
Fig. 3, 4 & 5. Young asci dissected from the hybrid perithecia are at their one-, two- and four-nucleated stage, respectively.
- 圖 6. 幼小子囊達八核期後，每一核外圍以細胞壁，爲子囊孢子的雛形。
Fig. 6. Eight cells each with one nucleus are going to be ascospores in a ascus.
- 圖 7. 一子實體內，若干色深而短的幼小子囊，正進行減數分裂；色淺而長的子囊內，多數正在形成子囊孢子。
Fig. 7. Asci obtained from a hybrid perithecium are at their various growing stages. The young and deep colored ones are suited for meiosis observation.
- 圖 8. 減數分裂早粗絲期，染色體長而紊亂，難以計數。
Fig. 8. Two asci are dividing at early pachytene stage; chromosomes are long and clumped.
- 圖 9. 減數分裂粗絲期，9A 爲九條二價染色體，9B 爲其圖解，最長的自 11 點方向下跨至 5 點半方向，最短的則位於其右的五點方向。
Fig. 9. One ascus is at pachytene stage with nine bivalents. 9B is a sketch of 9A.
- 圖 10. 減數第一分裂末期，染色體已趨向兩極，中間有染色體橋相連。
Fig. 10. One ascus is at anaphase I, showing a bridge between two poles.
- 圖 11. 減數分裂現叉期，11A 示四條二價染色體，上方三條並列，下方則一條短的單列。11B 中示五條二價染色體，由上至下，第一、二及第五叁條色深，尙未現叉，第二、三兩條的同源染色體已分開，祇藉交叉點相連。
Fig. 11. One ascus with nine chromosomes is at diplotene stage. 11B is showing five of the nine; among the five the homologues of the middle two chromosomes were held by chiasmata. 11A showing the remaining four which were flooded away during preparation.
- 圖 12. 減數第一分裂中期，A 及 B 爲不同焦距，合而顯示該子囊至少有八個二價染色體。
Fig. 12. Ascus at metaphase I, at least eight bivalents can be counted with 12A and 12B which were taken in different focuses.
- 圖 13. 減數第一分裂早後期，至少可數到十六黑點，代表十六個單價染色體。
Fig. 13. Ascus at early anaphase I, sixteen dots (most likely representing univalents) were counted.
- 圖 14. 幼小子囊的八核晚期，細胞壁或已開始形成。箭頭所指細胞正達第一有絲分裂中期，可數出九個染色體。
Fig. 14. A late eight-nucleated ascus, walls were likely beginning to deposit around the nucleus. One of the eight is at first mitotic metaphase, showing nine chromosomes (arrow head).
- 圖 15. 一子囊中具八個由二個細胞構成的子囊孢子。箭頭所指一子囊孢子正行第二有絲分裂中後期，左半爲六個染色體，右半則爲六個染色分體。
Fig. 15. A maturing ascus with eight two-celled precusory ascospores, one of them is at second mitotic meta-anaphase, showing six chromosomes at left side and six separating chromatids at right side (arrow head).
- 圖 16. 一子囊中祇有兩個子囊孢子可能繼續其發育，其餘六個則已不見其行踪。
Fig. 16. A maturing ascus with only two precusory ascospores.







CHROMOSOMES IN RICE BLAST FUNGUS¹HSIN-KAN WU² and SHU-LIEN SUNG²*Institute of Botany, Academia Sinica
Nankang, Taipei, Taiwan 115, Republic of China*

Chromosomes in rice blast fungus have been studied mostly by HCl-Giemsa staining and at mitotic phases. Generally speaking, workers agree that the haploid number of chromosome is six. The authors tried to count chromosomes of *Pyricularia* hybrids at meiosis of the sexual rather than at mitotic phase of the asexual by adopting Barry's technique.

The fertility of the hybrids obtained from the crosses between the local *P. oryzae* races to Yaegashi's Ken-82-13 was quite low compared with that of those crosses between Kato's strains to Ken-82-13. However, both hybrid groups contributed good dividing configurations for chromosome observations.

From the counts at pachytene (Fig. 9), metaphase I (Fig. 12) and anaphase I (Fig. 13) of the meiosis, as well as those at mitotic metaphases (Figs. 14 and 15) in the young hybrid asci, the authors concluded that haploid chromosome number of the rice blast fungus is more than six and likely of nine.

The existence of the morphologically different homologous chromosomes (Fig. 11B), of the bridge between the telophasic poles (Fig. 10) and of the partial sterility in the hybrid ascus (Fig. 16) suggested that the genomes of the parents used in this study might consist of some different chromosomes, although their chromosome numbers are equal. The use of acetic-lactic-Orcien, instead of HCl-Giemsa, is highly recommended in future cytogenetical studies of the important genes such as those for pathogenicity, mating type, etc. in rice blast fungus.

¹ Paper No. 281 of the Scientific Journal Series, Institute of Botany, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, Republic of China.

² Research Fellow and research assistant, respectively.