

不同诱导方法对农杆菌介导的木霉菌遗传转化效率的影响

曲连海 杨谦*

(哈尔滨工业大学 生命科学与技术学院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘 要: 【目的】比较不同诱导方法对根癌农杆菌 EHA105 介导的哈茨木霉 T88 遗传转化体系转化效率的影响, 以确定最佳的诱导方法。【方法】通过对复铺培养基法、转膜培养法和液体共培养法转化效率的比较来确定 3 种方法的优劣。【结果】复铺培养基法转化效率约为 10 个转化子/ 10^7 个木霉孢子, 转膜培养法转化效率约为 20 个转化子/ 10^7 个木霉孢子, 液体共培养法转化效率达到 100 个转化子/ 10^7 个木霉孢子。【结论】在农杆菌介导的木霉菌遗传转化体系中, 液体共培养法的转化效率最高, 是常用的复铺培养基法及转膜培养法转化效率的 5–10 倍。

关键词: 根癌农杆菌, 哈茨木霉, 转化效率

Influence of different induction methods on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency of *Trichoderma*

QU Lian-Hai YANG Qian*

(School of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

Abstract: [Objective] To determine the optimum induction method, different induction

基金项目: 黑龙江省重大科技攻关项目(No. GA08B101); 生产淀粉废弃物(薯渣)生物处理技术与资源化处理(中试)基金项目(No. TA09Q906)

*通讯作者: ✉ yangq@hit.edu.cn

收稿日期: 2012-05-09; 接受日期: 2012-10-22

methods on *Agrobacterium tumefaciens* EHA105-mediated transformation system of *Trichoderma harzianum* T88 were investigated. [Methods] By comparing the conversion efficiency of double cultivation, blotting cultivation and liquid co-cultivation, the optimum induction method can be determined. [Results] The conversion efficiency of double cultivation is about 10 transformants per 10^7 conidia, the conversion efficiency of blotting cultivation is about 20 transformants per 10^7 conidia, while the conversion efficiency of liquid co-cultivation is about 100 transformants per 10^7 conidia. [Conclusion] The conversion efficiency of liquid co-cultivation is the maximum in *A.tumefaciens*-mediated transformation system of *T. harzianum*, it is about 5–10 times of double cultivation and blotting cultivation.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *Trichoderma harzianum*, Conversion efficiency

木霉菌(*Trichoderma* spp.)是一种重要的植物病害生物防治菌, 建立有效的木霉菌遗传转化体系是构建高效生物防治菌株和研究其基因功能的前提。自从 1998 年 de Groot 等发现农杆菌介导转化法(*Agrobacterium tumefaciens* transformation, ATMT)可以对丝状真菌进行成功转化并且转化效率远高于常规方法^[1], ATMT 就被广泛地应用于丝状真菌的转化。与传统转化方法相比, ATMT 具有操作简便、转化效率高和易得到稳定转化子的特点^[2]。在根癌农杆菌介导的木霉菌遗传转化体系中, 影响转化效率的因素有很多, 包括农杆菌菌株类型、乙酰丁香酮的用量及使用时间、转化真菌的受体类型及浓度、根癌农杆菌的培养时间及用量、转化时间及转化温度等多方面的因素^[3–9]。根据各文献中的叙述, ATMT 对木霉菌进行转化的效率一般在 25–180 个转化子/ 10^7 个孢子, 使用转膜培养法时转化效率要高于使用复铺培养基法, 并且假阳性率要低一些。然而, 在本实验中, 利用 ATMT 法使用根癌农杆菌 EHA105 对哈茨木霉 T88 进行了转化, 采用了常用的复铺培养基法及转膜培养法进行诱导转化, 可能由于采用菌株以及质粒的不同, 其转化效率均比较低, 只有 10–20 个转化子/ 10^7 个孢子, 并且假阳性率比较高, 达不到实验要求。为提高转

化效率, 本研究对其诱导培养的方法进行了改进, 采用了液体共培养的方法进行了诱导转化, 并与常用的复铺培养基法及转膜培养法进行了比较。

1 材料与方法

1.1 实验材料

根癌农杆菌(*A. tumefaciens*) EHA105、哈茨木霉(*T. harzianum*) T88 来源于实验室保藏菌株; 含有重组质粒 pCambia1301-perg22 的根癌农杆菌 EHA105 转化子由硕士毕业设计实验得到; 潮霉素、卡那霉素、头孢霉素、乙酰丁香酮、MES 等试剂均购于哈尔滨市伊事达公司; 潮霉素抗性基因引物序列(hyg-fp: GCTGGGGCGTCGGTTTCC ACTATCGG/hyg-rp: CGCATAACAGAGCGGTCA TTGACTGGAGC)由哈尔滨市博仕生物有限公司合成。

1.2 实验方法

哈茨木霉 T88 野生型孢子与根癌农杆菌 EHA105 转化子在诱导培养基上共培养 2 d 后, 在选择培养基上培养 5–7 d, 用含有潮霉素的 PDA 平板来筛选哈茨木霉 T88 的转化子, 多次传代后提取转化子的 DNA 进行鉴定。

1.2.1 哈茨木霉 T88 野生型对潮霉素的敏感性测试: 从哈茨木霉 T88 野生型 PDA 平板上用打孔器

打下菌片,分别接种到含有 0、50、100、150、200 mg/L 潮霉素的 PDA 平板上,28 °C 恒温培养,每 24 h 测量一次生长直径。

1.2.2 哈茨木霉转化子的筛选与鉴定:在选择培养基上选出生长的单菌落;将初筛的单菌落接种至含有 200 mg/L 潮霉素的 PDA 固体培养基上培养,传代 20 次以后还可以正常生长,并可以在含有 200 mg/L 潮霉素^[10]的 PD 液体培养基中正常生长的,可以初步确定为转化子;对转化子提取 DNA^[11],用潮霉素抗性基因引物序列进行 PCR 鉴定。

1.2.3 3 种转化方法转化效率的比较:哈茨木霉 T88 野生型接种 PDA 固体培养基上,28 °C 培养 7 d,用 IM 液体培养基洗下孢子,血细胞计数板计数,适当稀释。根癌农杆菌 EHA105 转化子接种于含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中,28 °C 摇床培养约 48 h,IM 液体培养基稀释菌液至 $OD_{600} \approx 0.15$,继续培养 6 h 左右至 $OD_{600} \approx 0.5$ 。

(1) 复铺培养基法:孢子浓度为 10^6 个/mL,农杆菌转化子在 $OD_{600} \approx 0.5$ 时,取 100 μ L 孢子悬液与 100 μ L 农杆菌转化子混匀涂布于含有乙酰丁香酮 200 μ mol/L 和 MES 40 mmol/L 的 IM 固体培养基上,28 °C 培养 2 d,用含有 300 mg/L 头孢霉素和 200 mg/L 潮霉素的 M-100 固体培养基 10 mL 融化后置于 IM 固体培养基上,28 °C 避光培养 5–7 d,可以看到有抗性菌落穿透 M-100 固体培养基^[12]。

(2) 转膜培养基法:哈茨木霉 T88 野生型孢子浓度为 10^6 个/mL,根癌农杆菌 EHA105 转化子在 $OD_{600} \approx 0.5$ 时,取 100 μ L 孢子悬液与 100 μ L EHA105 转化子混匀涂布于含有乙酰丁香酮 200 μ mol/L 和 MES 40 mmol/L 的表面铺上玻璃纸的 IM 固体培养基上,28 °C 避光培养 2 d,将玻璃纸反铺到含有 300 mg/L 头孢霉素和 200 mg/L 潮霉素的 M-100 固体培养基上,28 °C 避光培养 48 h,

揭下玻璃纸,28 °C 继续培养 3–5 d,可以看到有抗性菌落长出^[13]。

(3) 液体共培养法:哈茨木霉 T88 野生型孢子浓度调整为 5×10^6 个/mL,根癌农杆菌 EHA105 转化子在 $OD_{600} \approx 0.5$ 时,取 1 mL 孢子悬液与 5 mL EHA105 转化子 5 000 r/min 离心后的菌体混匀于 50 mL 含有乙酰丁香酮 200 μ mol/L 和 MES 40 mmol/L 的 IM 液体培养基中,28 °C 摇床培养约 48 h,取 200 μ L (1 mL 浓缩)涂布于含有 300 mg/L 头孢霉素和 200 mg/L 潮霉素的 M-100 固体培养基上,28 °C 避光培养 5–7 d,可以看到有抗性菌落长出。

2 结果与分析

2.1 哈茨木霉 T88 野生型对潮霉素的敏感性测试

潮霉素是一种十分方便的显性选择标记,培养基中合适的潮霉素浓度能有效地抑制野生型哈茨木霉的生长,利用根癌农杆菌 EHA105 介导能将质粒 pCambia1301 中的潮霉素抗性基因导入到哈茨木霉菌株中,使哈茨木霉转化子菌株生长不受潮霉素抑制而被筛选出来。为了确定筛选培养基中潮霉素的浓度,将哈茨木霉 T88 用打孔器打下直径为 0.80 cm 的菌片,在不同浓度的潮霉素 PDA 平板接种 5 d,观察其生长状况并进行比较,结果表明:潮霉素浓度为 0 的 PDA 平板上,野生型 T88 菌落正常生长;而在潮霉素浓度分别为 50、100、150、200 mg/L 的 PDA 平板上,野生型 T88 菌株生长被抑制,直径一直未发生变化。表明 50 mg/L 的潮霉素浓度能有效地抑制野生型哈茨木霉 T88 的生长,为更好地保证筛选效果,选择 200 mg/L 的潮霉素浓度作为筛选浓度。

2.2 哈茨木霉转化子的筛选与鉴定

挑选出的哈茨木霉转化子进行传代培养 20 次,选取能够在含有 200 mg/L 潮霉素的 PD 液体

培养基及含有 200 mg/L 潮霉素的 PDA 固体培养基上正常生长, 从中取 6 株, 提取菌株的总 DNA, 用潮霉素抗性基因引物 *hyg-fp* 和 *hyg-rp* (用该引物扩增得到的潮霉素抗性基因片段约为 1 022 bp) 进行 PCR 扩增。PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示, 所挑取的转化子的扩增产物呈现出与阳性对照相同的特异性片段, 而阴性对照没有特异条带出现, 说明潮霉素抗性片段成功插入至哈茨木霉转化子的基因组中。

2.3 3 种转化方法的转化效率比较

在使用液体共培养法进行诱导转化的同时使用了复铺培养基法与转膜培养法进行对比, 3 种方法转化效率有所不同, 如图 2 所示: 复铺培养

基法转化效率最低, 在 10 个转化子/10⁷ 个木霉孢子左右; 转膜培养法次之, 达到 20 个转化子/10⁷ 个木霉孢子左右; 而液体共培养法转化效率最高, 达到 100 个转化子/10⁷ 个木霉孢子。

3 讨论

建立高效成熟的转化体系是研究基因功能的重要前提, 根癌农杆菌介导的转化系统因其简便、高效以及外源基因易于整合等优点, 在植物、动物、微生物基因转化中得到广泛的应用。

本实验建立了基于根癌农杆菌 EHA105 和质粒 pCambia1301-perg22 的哈茨木霉 T88 菌株遗传转化系统, 并采用不同诱导方法进行了诱导转化, 通过比较发现液体共培养法转化率最高, 达到约 100 个转化子/10⁷ 个孢子, 而复铺培养基法与转膜培养法的转化效率只有 10–20 个转化子/10⁷ 个孢子。

在本实验中, 复铺培养基法与转膜培养法转化效率要明显低于文献中的数据, 这可能是由于采用菌株及质粒的不同、以及载体的差异和实验环境的差异导致的结果。

液体共培养法转化率较高的原因可能是在液体共培养时农杆菌与木霉菌的孢子接触更加充分, 并无需穿透选择培养基。相对于复铺培养基法与转膜培养法, 液体共培养法在操作上更加简便, 减少了污染的可能。

在根癌农杆菌 EHA105 介导的哈茨木霉 T88 遗传转化体系中, 液体共培养诱导法具有操作简便、不易污染、转化效率高以及容易筛选转化子等优点, 对哈茨木霉 T88 的基因功能研究有重大意义。并且, 这种液体共培养的诱导转化法也可以应用到其他能够产生孢子的丝状真菌上, 有可能成为研究丝状真菌基因功能的更加有效的手段, 对使用 ATMT 方法进行丝状真菌的转化有重大的借鉴意义。

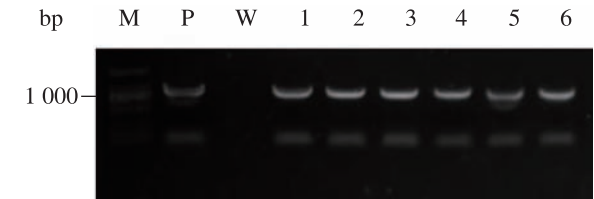


图 1 转化子潮霉素抗性基因鉴定
Fig. 1 Verification of hygromycin gene
Note: M: Marker DL2000; P: Plasmid pCambia1301; W: Wild type T88; 1–6: Transformants 1–6.

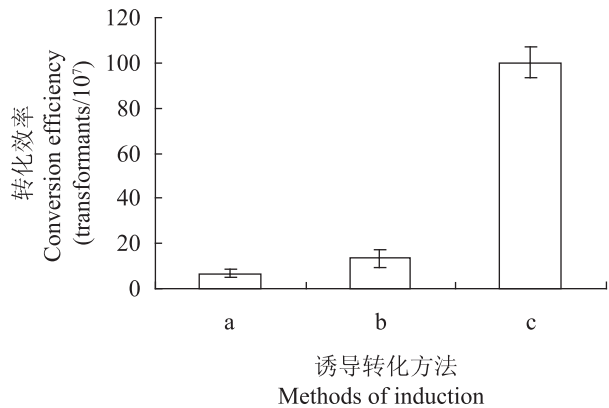


图 2 不同诱导方法的转化效率
Fig. 2 Conversion efficiency of different induction methods
注: a: 复铺培养基法; b: 转膜培养法; c: 液体共培养法。
Note: a: Double cultivation; b: Blotting cultivation; c: Liquid co-cultivation.

参 考 文 献

- [1] De Groot MJA, Bundock P, Hooykaas PJJ, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(9): 839-842.
- [2] 方卫国, 张永军, 杨星勇, 等. 根癌农杆菌介导真菌遗传转化系统的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2002, 22(5): 40-44.
- [3] 赵湛, 李文生. 不同根癌农杆菌菌株类型对木霉菌遗传转化效率的影响[J]. *北方园艺*, 2006(3): 14-15.
- [4] Michielse CB, Hooykaas PJJ, Van den Hondel CAMJJ, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. *Current Genetics*, 2005, 48(1): 1-17.
- [5] Zeilinger S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Current Genetics*, 2004, 45(1): 54-60.
- [6] 李国田, 杨合同, 周红姿. 根癌农杆菌介导的木霉菌插入转化及其应用[J]. *山东科学*, 2006, 19(6): 24-30.
- [7] 高兴喜, 杨谦, 郭兆奎, 等. 影响根癌农杆菌介导的木霉菌遗传转化因素分析[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(1): 74-78.
- [8] 黄亚丽. 农杆菌介导哈茨木霉转化系统优化及突变体分析[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2008.
- [9] Paul B, Den Bulk-Rus A, Beijersbergen A, et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The EMBO Journal*, 1995, 14(13): 3206-3208.
- [10] Hanif M, Pardo AG, Gorfer M, et al. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker[J]. *Current Genetics*, 2002, 41(3): 183-188.
- [11] 张颖慧, 魏东盛, 邢来君, 等. 一种改进的丝状真菌 DNA 提取方法[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(3): 466-469.
- [12] 高兴喜, 杨谦, 宋金柱, 等. 根癌农杆菌介导的木霉菌遗传转化方法[J]. *高技术通讯*, 2004(5): 32-35.
- [13] 黄亚丽, 蒋细良, 田云龙, 等. 根癌农杆菌介导的哈茨木霉菌遗传转化的研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(3): 38-43.