

影响根癌农杆菌介导的木霉菌遗传转化因素分析*

高兴喜 杨 谦** 郭兆奎 宋金柱

(哈尔滨工业大学生命科学与工程系 哈尔滨 150001)

摘要: 采用根癌农杆菌介导的转化方法, 以木霉菌分生孢子为受体材料, 对影响转化效率的主要因素进行了分析。结果表明, 农杆菌菌株类型、初始菌液量、分生孢子浓度、共培养时间以及乙酰丁香酮的诱导等因素对转化效率都具有重要的影响。通过对这些因素的分析, 基本得出了根癌农杆菌转化系统对木霉菌遗传转化的特点和规律, 为将该转化系统用于其它丝状真菌的遗传转化提供了重要参考。

关键词: 根癌农杆菌, 遗传转化, 木霉菌

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0074-05

Factors Influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation in *Trichoderma harzianum*

GAO Xing-Xi YANG Qian GUO Zhao-Kui SONG Jin-Zhu

(Dept. of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001)

Abstract: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system was used to study on factors influencing transformation in *Trichoderma harzianum*. The results showed that the transformation efficiency was correlated with *A. tumefaciens* strains, bacterial cell volume initially used, concentration of conidia, co-cultivation time and acetosyringone induction. These findings should facilitate future study of *T. harzianum* and stimulate wider use of this valuable transformation method in other fungal transformation.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, Genetic transformation, *Trichoderma harzianum*

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 是一种革兰氏阴性土壤杆菌, 它能够在植物受伤部位侵染植物细胞, 将 T-DNA (transferred DNA) 转入植物细胞并整合进植物的基因组, 导致肿瘤的发生。de Groot 等人^[1,2] 将根癌农杆菌介导的转化系统用于真菌的遗传转化, 并取得了巨大成功。根癌农杆菌介导的真菌遗传转化方法不但效率高, 操作方便, 而且具有遗传稳定, 拷贝数低, 重复性好等优点, 克服了传统的丝状真菌原生质体转化法所具有的操作复杂、重复性差、转化效率低等问题^[3-5]。

本文在利用这一转化系统对生防真菌木霉菌 (*Trichoderma harzianum*) 转化成功的基础上^[6], 对影响转化效率的因素进行了分析, 为将来更好地利用这一转化系统对木霉菌以及其它丝状真菌的遗传转化提供重要参考。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

根癌农杆菌 AGL-1 由中国科学院遗传与发育研究所储成才教授惠赠; LBA4404 为

*国家自然科学基金资助项目 (No. 50178021)
Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 50178021)

**联系人 Tel: 0451-86412952, E-mail: yangq@hope.hit.edu.cn

收稿日期: 2004-04-23, 修回日期: 2004-06-06

本室保存; 木霉菌 (*T. harzianum*) T88 来源于河北农业大学。

根癌农杆菌质粒 pPK2 来源于 S. F. Covert 教授 (University of Georgia, USA), 该质粒带有潮霉素抗性基因。

1.2 农杆菌的活化培养

质粒 pPK2 采用冻融法直接转化到农杆菌 AGL-1 和 LBA4404 中, 从 LB 平板 (含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素) 上挑取一农杆菌单菌落接种于 7 mL LB 液体培养基 (含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素), 250 r/min, 29 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。第 2 天用 MM 液体培养基 (含或不含 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 乙酰丁香酮, AS) 稀释至 OD_{660} 大约 0.15, 继续培养大约 4 h 至 OD_{660} 为 0.6 ~ 0.8。

1.3 不同初始菌量农杆菌菌液的制备

分别取已活化培养到一定 OD 值的农杆菌菌液 50 μL 、100 μL 、150 μL 、200 μL 、250 μL 于不同微量离心管中, 4,000 r/min 离心 5 min, 去上清, 再分别用 100 μL MM 液体培养基悬浮沉淀, 用于转化。

1.4 真菌孢子悬液的制备

用 5 mL 灭菌蒸馏水从培养 5 ~ 7 d 的 PDA 平板上洗下木霉菌的分生孢子, 血球计数板计数, 然后用 MM 液体培养基稀释至相应的孢子浓度 ($10^3 \sim 10^8$ 个/mL)。

1.5 转化

用不同初始菌量制备的 100 μL 农杆菌菌液和 100 μL 稀释到一定浓度的真菌孢子悬液混合后涂布在 MM (含或不含 AS) 平板上, 27 $^{\circ}\text{C}$ 共培养 12 ~ 60 h 后, 在平皿中倒入 10 mL M-100 固体培养基^[7] (含 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素和 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢霉素), 27 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养, 大约 5 ~ 7 d 可见菌落出现。

1.6 转化子 PCR-Southern blot 检测

木霉菌总 DNA 的提取按文献 [8] 方法进行, 潮霉素抗性基因 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

用于标记探针的模板为质粒 pPK2 上潮霉素抗性基因的 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切片段, 探针的标记及杂交按试剂盒 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (购于 Roche 公司) 上提供方法进行。

2 结果与分析

2.1 农杆菌菌株类型对转化的影响

为了检验根癌农杆菌在介导丝状真菌遗传转化中是否具有宿主特异性, 选择两种常用具有代表性的农杆菌菌株, 即章鱼碱型菌株 LBA4404 和农杆菌型菌株 AGL-1 为宿主, 对丝状真菌木霉菌进行了 3 次重复转化, 结果 AGL-1 在对木霉菌的转化中获得成功, 而 LBA4404 在转化中失败。由此可见, 根癌农杆菌介导的丝状真菌的遗传转化和植物一样, 同样具有宿主特异性。

2.2 乙酰丁香酮 (AS) 对转化的影响

在农杆菌介导的植物遗传转化中, *vir* 基因的活化需要 AS 等的诱导。为了检验农杆菌介导的真菌转化是否也需要 AS 的诱导, 在实验中设计了如下处理: 农杆菌活化培养时加入和不加入 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AS; 共培养时加入和不加入 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AS, 转化结果见表 1。可以看出在农杆菌与真菌孢子共培养进行转化时, 如果共培养基中不加入 AS,

而在农杆菌活化培养时加入 AS 和不加入 AS，都不能实现转化，但在共培养之前农杆菌活化培养时加入 AS 能够显著提高转化率。可见农杆菌介导的丝状真菌转化同植物一样，也需要 AS 对 *vir* 基因的诱导。

2.3 农杆菌初始菌液量对转化的影响

农杆菌经活化培养到对数期 (OD_{660} 约为 0.62)，分别取 50 ~ 250 μL 菌液于各微量离心管中，离心去上清，用 100 μL MM 液体培养基重新悬浮沉淀后，分别与 100 μL 木霉菌分生孢子 (10^7 个/mL) 混合，涂平板共培养 48 h 后，再在原来平板上倒选择培养基进行转化子筛选，结果如图 1 所示，随着农杆菌初始菌液量的增加，转化率逐渐升高，但当初始菌液量增加到 100 μL 以上时，转化率升高不再明显，当初始菌液量增加到 200 μL 时，转化率达到最高 (190 个转化子/ 10^7 个孢子)，此时如果再继续增加初始菌液量，反而使转化率呈现下降趋势。这可能是因为农杆菌浓度过高导致过度生长，从而抑制了真菌在培养基上的生长，致使转化率下降。可见，在一定范围内，可通过增加农杆菌初始菌液量提高转化率。

表 1 不同 AS 处理对转化率的影响

	活化培养 + AS	活化培养 -AS
培养 + AS	50 ~ 190	10 ~ 86
培养 - AS	0	0

注：初始农杆菌菌量 100 μL ，木霉菌孢子浓度为 10^6 个/mL，共培养时间 48 h

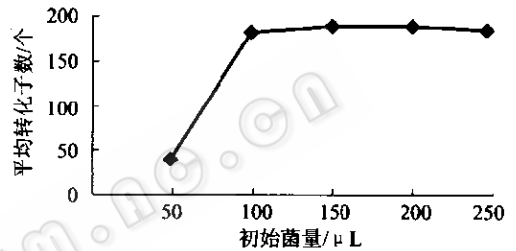


图 1 农杆菌初始菌量对转化的影响

2.4 真菌孢子浓度对转化的影响

农杆菌经活化培养后，分别取 100 μL 初始菌液与 100 μL 不同浓度的木霉菌分生孢子悬液混合，涂板共培养 48 h 后进行转化子筛选，结果如图 2 所示，转化成功要求孢子浓度必须达到一定值 (10^3 个/mL)，随着孢子浓度不断升高转化率也升高，但当孢子浓度升高到一定值时 (10^6 个/mL)，转化率升高不再显著。这可能是因为农杆菌介导的真菌转化中，细菌浓度与真菌孢子浓度之间存在着一一定的比例关系，结合图 1 我们可以看出，如果两者比例相差太大，不利于转化的实现，而且要使转化成功，两者浓度都不能太低。

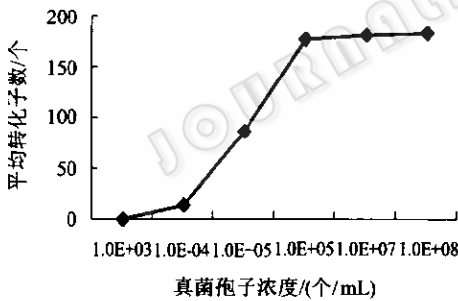


图 2 真菌孢子浓度对转化的影响

存在着一一定的比例关系，结合图 1 我们可以看出，如果两者比例相差太大，不利于转化的实现，而且要使转化成功，两者浓度都不能太低。

2.5 共培养时间对转化的影响

为了检验共培养时间对转化的影响，在共培养时，分不同时间段倒选择培养基，结果如图 3，共培养 12 h 进行筛选时没有得到转化子，共培养 24 h 得到少量转化子，随后随着共培养时间的延长，转化率显著升高，共培养 48 h，转化率达到最高，继续培养转化率升高不明显，甚至有些下降。这可能是因为木霉菌的过度生长，菌落之间相互重叠覆盖，以及非转化子对转化子生长的竞争作用，都可能造成转化率的降低。

2.6 转化子的 PCR-Southern 杂交检测

随机挑取 6 个转化子菌落, 以野生型木霉菌株为对照, 在 PD 液体培养基培养 3 d 后, 提取基因组 DNA 进行 PCR 检测 (图 4a), 6 个样品均扩增出潮霉素抗性基因的特异片段。对潮霉素抗性基因 PCR 产物进行 Southern 杂交 (图 4b), 6 个样品均有杂交信号出现, 表明通过根癌农杆菌介导的遗传转化方法已经实现了潮霉素抗性基因对木霉菌的转化。

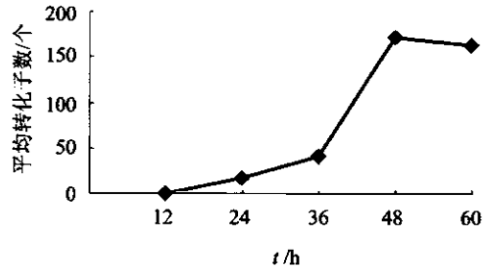


图 3 共培养时间对转化的影响

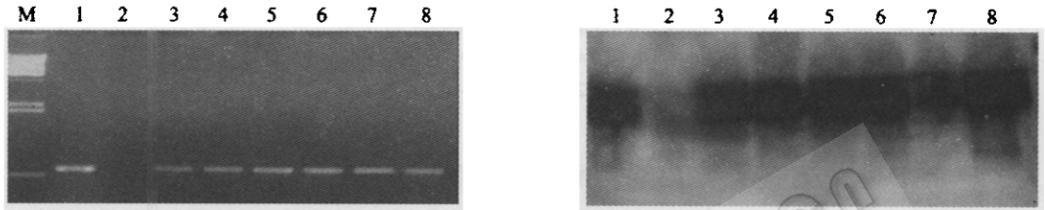


图 4 转化子潮霉素抗性基因 PCR (a) 及 PCR 产物 (b) Southern 杂交结果
M 为 Maker: λ DNA/*Hind*III, 1 质粒 pPK2, 2 为野生菌株, 3~8 转化子

3 讨论

本实验选用章鱼碱型农杆菌菌株 LBA4404 和农杆菌型菌株 AGL-1 为宿主, 在木霉菌的转化中只有农杆菌型菌株 AGL-1 介导的转化获得成功, 这可能是由其染色体背景不同导致的结果, 这也预示着根癌农杆菌介导丝状真菌的遗传转化可能与介导植物的遗传转化具有相似的机制和特征。根癌农杆菌介导的木霉菌转化和植物转化一样, 也需要 AS 等物质的诱导, 特别是在共培养阶段, 培养基中不加 AS 时, 没有阳性菌落出现, 说明 *vir* 基因的诱导对 T-DNA 向木霉菌转移同样是必要的。

根癌农杆菌初始菌液量和木霉菌分生孢子浓度对转化都具有显著的影响, 而且要保证转化获得成功, 两者都必须达到一定数值, 初始菌液量和孢子浓度都不能太低, 否则转化很难获得成功。而另一方面, 初始菌液量或孢子浓度过高对转化反而不利。这可能是由于农杆菌在侵染孢子时, 相对于单个孢子而言, 农杆菌需要达到一定密度才能侵染成功, 而且两者之间可能存在着一定的比例关系。

共培养时间对转化的影响也十分明显, 农杆菌侵染孢子并完成 T-DNA 的整合需要一定的时间, 筛选培养基加入过早或过晚都不利于转化的成功, 加入过早, 农杆菌尚未完成侵染过程, 加入过晚不利于外源基因的表达, 同时也会因非转化子的过度生长对转化子产生竞争抑制, 因此, 确定适当的共培养时间对转化获得成功极为重要。本实验以农杆菌 AGL-1 介导的木霉菌转化, 共培养时间以 48 h 为宜。当然, 不同的农杆菌菌株类型和不同的真菌种类, 以及同一种真菌的不同外殖体类型, 在转化时最佳共培养时间可能都会有所不同。

根癌农杆菌介导的遗传转化系统是近年来才开始应用到丝状真菌遗传转化研究, 因此还远没有成为一种常规操作, 对其转化机制以及转化条件的研究还不很深入。对

影响转化的因素尚缺乏较系统的研究,除了前面提到的几个影响因素外,载体启动子特异性、真菌菌株类型以及真菌受体材料(分生孢子、菌丝、原生质体等)都可能影响转化的成功,这些都有待于以后更深入研究。通过对影响根癌农杆菌介导的木霉菌转化因素分析,基本得到了该转化方法在木霉菌遗传转化上的一些特点和规律,这对于建立木霉菌以及其它丝状真菌新的遗传转化系统具有重要的参考价值。

参 考 文 献

- [1] Groot M J A, de Bundock P, Hooykaas P J J, *et al.* *Nat Biotechnol*, 1998, **16**: 839 ~ 842.
- [2] Gouka R J, Gerk C, Hooykaas P J J, *et al.* *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 598 ~ 601.
- [3] Covert S F, Kapoor P, Lee M, *et al.* *Mycol Res*, 2001, **105** (3): 259 ~ 264.
- [4] Hanif M, Pardo A G, Gorfer M, *et al.* *Curr Genet*, 2002, **41**: 183 ~ 188.
- [5] Rho H S, Kang S, Lee Y H. *Mol Cells*, 2001, **12** (3): 407 ~ 411.
- [6] 高兴喜, 杨 谦, 宋金柱, 等. 高技术通讯, 2004, **14** (161): 32 ~ 35.
- [7] Stevens R. *Mycology Guidebook*. University of Washington Press, 1974. 376.
- [8] Russo P, Juuti J T, Raudaskoski M. *Gene*, 1992, **119**: 175 ~ 182.