



研究报告

农杆菌介导的棉花枯萎病菌转化体系的优化

刘叶^{1,2,3} 阿依保他·托合达白^{1,2,3} 郭楠楠^{1,2,3} 柳自清^{1,2,3} 张博然^{1,2,3}
朱琦^{1,2,3} 顾爱星^{*1,2,3}

1 新疆农业大学农学院 新疆 乌鲁木齐 830052

2 农林有害生物监测与安全防护重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830052

3 新疆农业大学农学院 棉花教育部工程研究中心 新疆 乌鲁木齐 830052

摘要:【背景】海岛棉相对陆地棉更易感枯萎病,一旦发生很难根治,使得枯萎病逐渐成为威胁新疆海岛棉产业发展的主要病害,但其致病机理目前还不是十分明确。【目的】揭示棉花枯萎病菌的遗传变异和致病机理,同时获得带有绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)标记的棉花枯萎病菌转化子用于观察其侵染海岛棉的途径。【方法】采用农杆菌介导的遗传转化(*Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation, ATMT)方法,对棉花枯萎病菌7号生理小种 st89 进行了遗传转化并对转化条件进行优化。【结果】农杆菌介导的遗传转化法转化棉花枯萎病菌的最佳条件为:150 mg/L 的潮霉素浓度能完全抑制棉花枯萎病菌的生长,浓度为 200 mg/L 的头孢噻肟钠能完全抑制农杆菌 LBA4404 生长,农杆菌起始浓度 OD_{600} 为 0.2,农杆菌预培养时间为 8 h,棉花枯萎病菌分生孢子浓度为 10^5 个/mL,枯萎病菌孢子悬液和农杆菌 LBA4404 比例为 1:1,乙酰丁香酮浓度为 200 μ mol/mL,共培养时间为 4 d,转化后培养温度 25 $^{\circ}$ C。利用优化的转化系统将 GFP 基因转入到棉花枯萎病菌中,转化效率最高可以达到 252 ± 7.37 个转化子/ 10^5 个孢子。PCR 扩增以及荧光观察表明 GFP 基因能够正常表达。【结论】转 GFP 基因的枯萎病菌的获得为深入研究棉花枯萎病入侵的机理奠定了基础。

关键词: 棉花枯萎病菌, 绿色荧光蛋白, 农杆菌介导的遗传转化

Foundation items: Postdoctoral Research Flow Station of Xinjiang Uygur Autonomous Region; Science and Technology Major Science and Technology Projects of the Ministry of Science and Technology of China (2018ZX08005-01B)

***Corresponding author:** E-mail: guai_xing@sina.com

Received: 16-12-2020; **Accepted:** 20-01-2021; **Published online:** 25-03-2021

基金项目: 新疆维吾尔自治区博士后科研流动站资助; 国家科技部科技重大专项(2018ZX08005-01B)

***通信作者:** E-mail: guai_xing@sina.com

收稿日期: 2020-12-16; **接受日期:** 2021-01-20; **网络首发日期:** 2021-03-25

Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for *Fusarium oxysporum*

LIU Ye^{1,2,3} Ayibaota·Tuohedabai^{1,2,3} GUO Nannan^{1,2,3} LIU Ziqing^{1,2,3}
ZHANG Boran^{1,2,3} ZHU Qi^{1,2,3} GU Aixing^{*1,2,3}

1 College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China

2 Key Laboratory of the Pest Monitoring and Safety Control of Crops and Forests of the Universities of the Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830052, China

3 Engineering Research Centre of Cotton, Ministry of Education, College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China

Abstract: [Background] Sea island cotton is more susceptible to *Fusarium wilt* than upland cotton. Once it occurs, it is difficult to cure, making *Fusarium wilt* gradually become the main disease threatening the development of sea island cotton industry in Xinjiang, but the pathogenesis is still unclear. [Objective] In order to reveal the genetic variation and pathogenic mechanism of *Fusarium oxysporum*, the green fluorescent protein (GFP) labeled transformants of *F. oxysporum* were obtained and used to observe its infection pathway to sea island cotton. [Methods] *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) mediated genetic transformation of cotton *fusarium wilt* race st89 is carried out and the transformation conditions were optimized. [Results] The optimum conditions for ATMT transformation of *F. oxysporum*: 150 mg/L hygromycin could completely inhibit the growth of *F. oxysporum*, 200 mg/L cefotaxime sodium completely inhibited the growth of *Agrobacterium* LBA4404, the initial concentration of *Agrobacterium* is OD_{600} 0.2, the pre-culture time of *Agrobacterium* is 8 h, The concentration of conidia is 10^5 spores/mL, the volume ratio of spore suspension of *F. oxysporum* to *Agrobacterium* LBA4404 is 1:1. The concentration of acetosyringone in co-culture is 200 μ mol/mL, co-culture time is 4 d, culture temperature after transformation 25 °C. Using the optimized transformation system, *GFP* gene is successfully transferred into *F. oxysporum*. Maximum transformation efficiency can be achieved 252 ± 7.37 transformants/ 10^5 spores. PCR amplification and fluorescence observation showed that *GFP* gene could be expressed normally. [Conclusion] The acquisition of GFP transgenic *F. oxysporum* laid a foundation for further study on the invasion mechanism of cotton *Fusarium wilt*.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, green fluorescent protein, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation

新疆是中国唯一的海岛棉产区^[1],近年来,海岛棉种植面积在不断增加,而海岛棉易感枯萎病,使得棉花枯萎病逐渐成为威胁海岛棉产业发展的主要病害^[2-3]。目前,我国关于陆地棉的棉花枯萎病的研究主要是通过抗病品种的选育与应用,由于海岛棉缺乏抗病品种,同时其致病机理目前还不是十分明确,因此发病面积逐年增加,目前已成为影响我国海岛棉生产发展的主要问题^[4-5]。

棉花枯萎病致病菌为尖孢镰刀菌萎蔫专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*),菌丝透

明,有间隔^[6]。关于棉花枯萎病的致病机理前人已有关研究,但是目前还不明确其具体机制,因此有必要建立一套有效的棉花枯萎病菌遗传转化体系为人们从基因水平研究其表达调控机制和进一步的菌株改造提供条件。农杆菌介导的遗传转化(*Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation, ATMT)技术有着操作简单、转化效率高、重复性好等优点,而且利用该方法获得的转化子具有遗传稳定性,在真菌遗传转化研究中被广泛应用^[7]。许苗苗等^[8]通过 ATMT 法构建了青色荧光标记的禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)转化

子。黄亚丽^[9]通过 ATMT 构建了含有 4 500 株哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)转化子的突变体库。王梅娟等^[10]通过 ATMT 法构建玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)突变体库。李春强等采用 ATMT 的方法对西瓜枯萎病菌进行了遗传转化并观察其在西瓜中的定殖情况^[11-12]。梁慎等^[13]采用 ATMT 的遗传转化方法实现了西瓜枯萎病菌的转化。侯甲男等^[14]利用原生质体转化法(Protoplast Transformatio, PEG)将 *GFP* 基因转入棉花枯萎病菌中。然而, 利用 ATMT 介导棉花枯萎病菌并优化其体系的文章还未见报道。同时绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)作为一种报告蛋白已被广泛应用于研究植物与真菌的相互作用, 用其标记的病原体可以在整个感染过程中进行观察并调查。因此, 建立一套高效而稳定的棉花枯萎病菌遗传转化体系, 研究棉花枯萎病菌在海岛棉中的侵染和定殖过程有助于培育新的海岛棉抗病品种, 同时为棉花枯萎病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

棉花枯萎病菌是由本实验室保存的中等致病力的 7 号生理小种 st89。二元质粒载体 pCH-sGFP 由江苏省农业科学院植物保护研究所刘延利老师惠赠, 该质粒载体含有绿色荧光蛋白 GFP 作为报告标记基因, 潮霉素 B *Hyg* 作为筛选的标记基因。质粒 PCH-sGFP 以冻融法转入农杆菌 LBA4404 中备用。

1.1.2 培养基

实验中使用的培养基有: PDA 培养基, LB 培养基^[8]。

IM 诱导培养基(g/L): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3.44, KH_2PO_4 1.45, NaCl 0.15, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50, $(NH_4)_2SO_4$ 0.50, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.067, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002 5, 葡萄糖 1.80, 吗啉乙磺酸 7.80, 甘油

5 mL, pH 5.4; 用于农杆菌的稀释。

CM 培养基: 在 IM 诱导培养基中加入 1.5% 琼脂; 用于诱导农杆菌侵染棉花枯萎病菌。

1.1.3 主要试剂和仪器

潮霉素 B、乙酰丁香酮、头孢噻肟钠、利福平、卡那霉素, Solarbio 公司; 吗啉乙磺酸(Monohydrate, MES), 福瑞克公司; 2×San Taq PCR Mix 预混液(含蓝染料), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 引物由华大基因合成。

高压蒸汽灭菌锅、Easy Cyclor PCR 仪, 济南好来宝医疗器械有限公司; 全自动凝胶成像仪, 上海土森视觉科技有限公司; 智能生化培养箱、高速冷冻离心机, 上海仪天科学仪器有限公司; 倒置荧光显微镜, 北京冠普佳科技有限公司。

1.2 潮霉素 B 对棉花枯萎病菌生长的影响

准备在 28 °C、220 r/min 培养 7 d 的棉花枯萎病菌菌株, 在含潮霉素 B 不同浓度(0、25、50、100、150、200 mg/L)的 PDA 培养基上, 分别接种枯萎病悬浮液 100 μ L (孢子浓度 10^6 个/mL)和直径 5 mm 的 PDA 菌饼(沿菌龄一致的菌落边缘打取), 每个浓度各 3 次重复, 28 °C 暗培养 5 d 后观察菌落生长情况, 确定潮霉素 B 的使用浓度。

1.3 头孢噻肟钠对根癌农杆菌抑菌浓度的测定

将含有质粒的根癌农杆菌接种于 LB 液体培养基中(含 50 μ g/mL Kan 和 25 μ g/mL Rif), 28 °C、200 r/min 振荡培养, 当 OD_{600} 值为 0.6 时, 取 150 μ L 农杆菌菌液涂布于含头孢噻肟钠分别为 0、50、100、150、200 μ g/mL 的 LB 平板上, 每个浓度 3 次重复, 28 °C 暗培养, 1 d 后观察平板中菌落的生长情况, 确定头孢噻肟钠的抑菌浓度。

1.4 棉花枯萎病菌的遗传转化

农杆菌的转化及培养^[13]: 质粒 pCH-sGFP 采用冻融法转化到农杆菌 LBA4404 中。挑取农杆菌单菌落于 LB 液体培养基中(含 50 μ g/mL Kan 和 25 μ g/mL Rif), 28 °C、200 r/min 振荡培养过

夜。12 h 后取 1.5 mL 菌液, 12 000 r/min 离心 2 min, 去上清, 用 IM 诱导培养基(含 200 $\mu\text{mol/L}$ Acetosyringone, AS)清洗 2 次, 再用适量 IM 诱导培养基(含 200 $\mu\text{mol/L}$ AS)悬浮菌体, 使之稀释至 OD_{600} 约为 0.15, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 继续振荡培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 备用。

棉花枯萎病孢子悬浮液的制备: 将野生型棉花枯萎病菌株 st89 于 PDA 培养基 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 7 d, 用适量灭菌蒸馏水冲洗菌株得到孢子悬液, 血球计数板计数, 用无菌水稀释调整至孢子浓度为 1×10^6 个/mL 后备用。

农杆菌介导棉花枯萎病菌遗传转化^[15]: 将准备好的农杆菌和孢子悬浮液分别取 100 μL 后等体积混合均匀; 将孔径为 0.45 μm , 直径为 50 mm 的微孔滤膜平铺到 CM (含 200 $\mu\text{mol/L}$ AS)平板上; 取 200 μL 混合液均匀涂布在微孔滤膜上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 共培养 2 d 后将微孔滤膜取下, 用 500 μL 无菌水冲洗收集共培养物, 按每皿 100 μL 将共培养物涂布于筛选培养基 PDA (含有 150 mg/L 的潮霉素 B 及 200 mg/L 的头孢)中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养约 5 d 能长出的菌落初步确定为转化子。

1.5 ATMT 介导棉花枯萎病菌条件的优化

影响 ATMT 转化效率的主要因子包括: 农杆菌起始浓度和预培养时间、孢子悬浮液浓度、孢子悬浮液和农杆菌比例、乙酰丁香酮浓度、共培养介质、共培养时间、培养温度、IM 的 pH 值^[16]。本实验后续条件的优化是在前面已确定的优化条件下进行。

(1) 农杆菌起始浓度和预培养时间的优化: 将含有质粒的农杆菌 LBA4404 按 1.4 方法培养和收集后, 以无菌 IM 液体培养基重悬至 3 个不同的浓度(OD_{600} 为 0.1、0.2、0.4), 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 下分别培养 0、4、6、8、12 h, 然后与等体积的孢子浓度 1×10^6 个/mL 的棉花枯萎病孢子悬浮液混匀, 每皿取 200 μL 混合液涂于 CM 培养基(含 200 $\mu\text{mol/mL}$ 乙酰丁香酮)的微孔滤膜上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 共

培养 60 h 后, 用 500 μL 无菌水冲洗微孔滤膜转移共培养物至 PDA 培养基(含头孢 200 mg/L 及潮霉素 B 150 mg/L), 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d, 筛选转化子, 计算转化效率。每处理培养 3 皿。筛选最佳农杆菌起始浓度和预培养时间。

(2) 孢子悬浮液浓度的优化: 在 PDA 培养基上培养棉花枯萎病菌, 待产孢后, 用无菌水稀释成 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 个/mL 4 个梯度, 其余步骤同 1.4 且在上述已优化的条件下进行, 每处理各 3 皿。筛选最佳孢子悬浮液浓度。

(3) 孢子悬浮液和农杆菌比例的优化: 将 1×10^5 个/mL 枯萎病菌孢子悬浮液和经诱导后的农杆菌按 1:1、1:2、2:1 这 3 个比例混合, 其余步骤同 1.4 且在上述已优化的条件下进行, 每处理各 3 皿。筛选最佳孢子悬浮液和农杆菌比例。

(4) 乙酰丁香酮浓度的优化: 将 CM 培养基中 AS 浓度设置为 0、100、200、300、400 $\mu\text{mol/mL}$, 其余步骤同 1.4 且在上述已优化的条件下进行, 每处理各 3 皿。筛选最适乙酰丁香酮浓度。

(5) 共培养介质的优化: 设置铺有微孔滤膜、玻璃纸及定性滤纸的 CM 培养基, 其余步骤同 1.4 且在上述已优化的条件下进行, 每处理各 3 皿。筛选最佳共培养介质。

(6) 共培养时间的优化: 将混合液涂布于 CM 平板上后, 28 $^{\circ}\text{C}$ 分别共培养 1、2、3、4、5、6 d, 其余步骤同 1.4 且在上述已优化的条件下进行, 每处理各 3 皿。筛选最佳共培养时间。

(7) 培养温度的优化: 设置培养温度为 24、26、28、30 $^{\circ}\text{C}$ 这 4 个梯度, 其余步骤同 1.4 且在上述已优化的条件下进行, 每处理各 3 皿。筛选最佳培养温度。

(8) IM 培养基 pH 值的优化: 将 IM 培养基用 HCl 分别将 pH 值调整为 5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0。其余步骤同 1.4 且在上述已优化的条件下进行, 每处理各 3 皿。筛选出最佳 IM 培养基的 pH 值。

1.6 转化子 PCR 检测和荧光观察

为了进一步验证阳性转化子, 取少量菌丝置于 100 μL NaOH 溶液(150 mmol/L)中沸水浴 10 min, 再加入 10 μL Tris-HCl 缓冲液(1 mol/L pH 8.0), 12 000 r/min 离心 2 min 后, 上清用作 PCR 的 DNA 模板^[17], 分别用 *GFP* 和潮霉素引物进行 PCR 验证。引物为 *GFP*-F (5'-GACGTAAACGGC CACAAGTT-3')和 *GFP*-R (5'-GAACTCCAGCAGG ACCATGT-3'); *Hyg*-F (5'-GATGTAGGAGGGCGT GGATA-3')和 *Hyg*-R (5'-CTCTGATAGAGTTGGTC AAG-3')。PCR 反应体系(25 μL): 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 *GFP* 及 10 $\mu\text{mol/L}$ *Hyg* 引物 F/R 各 1 μL , 2 \times San Taq PCR Mix 12.5 μL , DNA 模板 1 μL , ddH₂O 9.5 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 退火温度(*GFP* 引物退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$, *Hyg* 引物退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$) 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测分析, 观察记录结果。PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

取 PCR 鉴定结果为阳性的转化子的菌丝和分生孢子样品制作临时玻片, 在倒置荧光显微镜下观察是否有绿色荧光。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导棉花枯萎病菌遗传转化

2.1.1 潮霉素 B 对棉花枯萎病菌的敏感性

棉花枯萎病菌在含不同浓度潮霉素 B 的 PDA

培养基上培养后, 其生长受到不同程度的抑制。当潮霉素 B 的浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 棉花枯萎病菌培养 7 d 后菌落已覆盖全皿; 25–100 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素 B 使菌株生长受到强烈抑制, 在 150 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素 B 上的菌丝完全不能生长。因此, 本研究以 150 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素 B 来筛选转化子。

2.1.2 头孢噻肟钠对根癌农杆菌抑菌浓度的测定

农杆菌菌液涂于含有不同浓度头孢噻肟钠的 LB 培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d 后, 在浓度为 0、50、100、150 $\mu\text{g/mL}$ 的处理中均能出现菌落, 200 $\mu\text{g/mL}$ 的处理无菌落出现。因此, 筛选转化子时选择头孢浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 作为农杆菌的抑菌浓度。

2.1.3 农杆菌起始浓度和预培养时间对转化效率的影响

实验结果发现在其他条件不变的情况下, 当农杆菌起始浓度 OD_{600} 为 0.2, 预培养时间为 6 h 时, 可以得到 108.33 个转化子/ 10^5 个孢子, 当农杆菌浓度 OD_{600} 为 0.1, 预培养时间为 8 h 时, 可以得到 127.67 个转化子/ 10^5 个孢子, 结果发现适当增加农杆菌的起始浓度至 OD_{600} 为 0.2, 并且在预培养时间至 8 h 的转化率最高, 得到 217.33 个转化子/ 10^5 个孢子。若将农杆菌起始浓度增加至 OD_{600} 为 0.4, 预培养时间为 8 h 时, 仅能得到 42.67 个转化子(图 1)。

2.1.4 孢子悬浮液浓度对转化效率的影响

孢子悬浮液浓度在 10^4 、 10^6 、 10^7 个/mL 时转

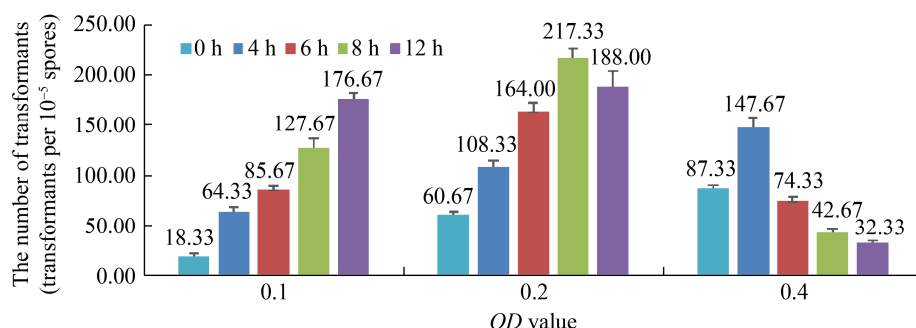


图 1 农杆菌起始浓度和预培养时间对转化效率的影响

Figure 1 Effect of *Agrobacterium tumefaciens* initial concentration and preculture time on conversion efficiency

化率分别为 182、174、133 个转化子/ 10^5 个孢子，孢子悬浮液浓度在 10^5 个/mL 时转化率最高，可以得到 217.66 个转化子/ 10^5 个孢子(图 2)，过高的孢子悬浮液浓度可能造成转化子假阳性较高。

2.1.5 孢子悬浮液和农杆菌比例对转化效率的影响

分别设置孢子悬浮液和农杆菌的体积比为 1:1、1:2、2:1，当孢子悬浮液与根癌农杆菌的体积比为 1:1 时，转化效率为 236.33 个转化子/ 10^5 个孢子，将农杆菌增加 1 倍二者体积比达到 1:2 时，转化子的数量显著降低为 163.67 个转化子/ 10^5 个孢子，当孢子悬浮液增加 1 倍二者体积比例达到 2:1 时，转化子的数量显著降低为 144.67 个转化子/ 10^5 个孢子(图 3)。

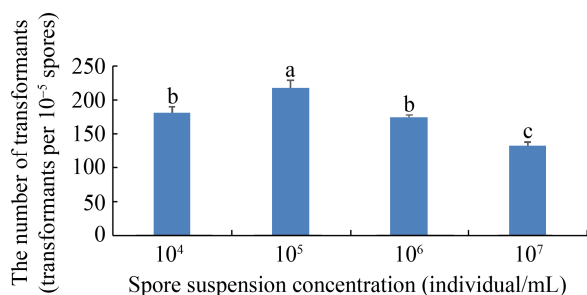


图 2 孢子悬浮液浓度对转化效率的影响

Figure 2 Effect of spore suspension concentration on conversion efficiency

注：a、b、c 为差异显著性标记($P<0.05$)

Note: a, b, c are significant difference markers ($P<0.05$)

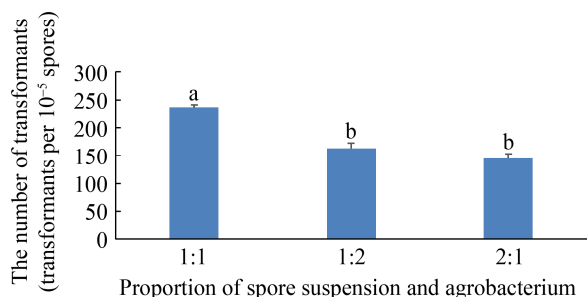


图 3 孢子悬浮液和农杆菌比例对转化效率的影响

Figure 3 Effect of spore suspension and *Agrobacterium* ratio on conversion efficiency

注：a 和 b 为差异显著性标记($P<0.05$)

Note: a and b are significant difference markers ($P<0.05$)

2.1.6 乙酰丁香酮浓度对转化效率的影响

分别设置 AS 浓度为 0、100、200、300、400 $\mu\text{mol/mL}$ ，当 AS 浓度为 0 $\mu\text{mol/mL}$ 时只有 26 个转化子/ 10^5 个孢子出现，随着 AS 浓度的增加转化率有所提高，当 AS 浓度为 200 $\mu\text{mol/mL}$ 时，转化率显著高于其余 AS 浓度的转化率，可以得到 246.33 个转化子/ 10^5 个孢子(图 4)。

2.1.7 共培养介质对转化效率的影响

分别设置铺有微孔滤膜、玻璃纸及定性滤纸的 CM 培养基。结果发现在定性滤纸上的转化效率为 44 个转化子/ 10^5 个孢子，玻璃纸的转化效率 81 个转化子/ 10^5 个孢子，微孔滤膜的转化效率为 245 个转化子/ 10^5 个孢子(图 5)，显著高于玻璃纸及定性滤纸的转化效率。

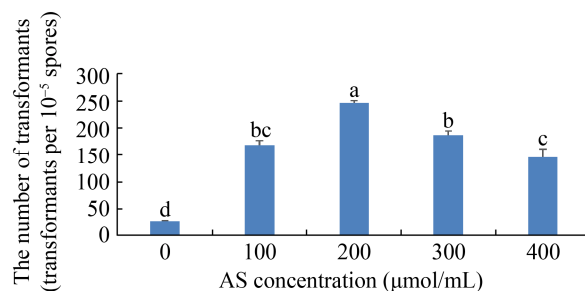


图 4 乙酰丁香酮浓度对转化效率的影响

Figure 4 Effect of AS concentration on conversion efficiency

注：a、b、c 为差异显著性标记($P<0.05$)

Note: a, b, c are significant difference markers ($P<0.05$)

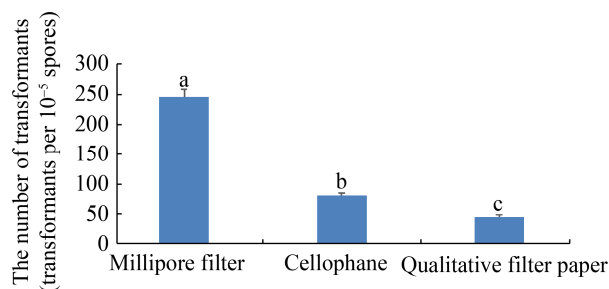


图 5 共培养介质对转化效率的影响

Figure 5 Effect of co-culture medium on conversion efficiency

注：a、b、c 为差异显著性标记($P<0.05$)

Note: a, b, c are significant difference markers ($P<0.05$)

2.1.8 共培养时间对转化效率的影响

本实验设置共培养时间分别为 1、2、3、4、5、6 d, 研究发现, 共培养时间 4 d 为最佳, 可以得到 247 个转化子/10⁵ 个孢子(图 6), 此时的转化效率显著高于其他培养时间, 若是继续增加共培养时间, 转化效率逐渐降低。

2.1.9 培养温度对转化效率的影响

共转化时过高的转化温度会使农杆菌的转化功能丧失, 过低的温度会导致各种菌体活性降低^[18]。分别设置培养温度为 24、26、28、30 °C 4 个梯度, 由图 7 可以看出, 其最佳共培养温度为 26 °C, 可以得到 249.67 个转化子/10⁵ 个孢子。当温度为 24、28 和 30 °C 时, 转化率分别为 191、224、187 个转化子/10⁵ 个孢子。

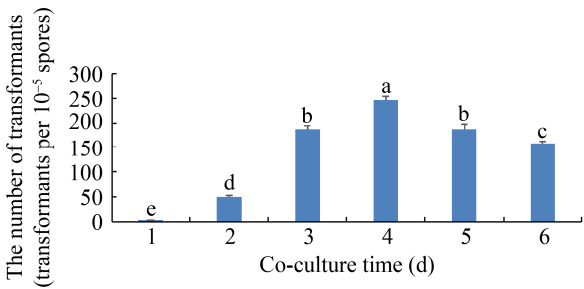


图 6 共培养时间对转化效率的影响
Figure 6 Effect of co-culture time on conversion efficiency
注: a、b、c、d、e 为差异显著性标记($P<0.05$)
Note: a, b, c, d, e are significant difference markers ($P<0.05$)

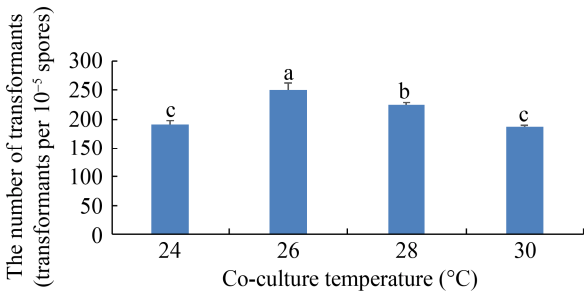


图 7 共培养温度对转化效率的影响
Figure 7 Effect of co-culture temperature on conversion efficiency
注: a、b、c 为差异显著性标记($P<0.05$)
Note: a, b, c are significant difference markers ($P<0.05$)

2.1.10 IM 培养基 pH 值对转化效率的影响

在固定温度和时间培养条件的基础上, 共培养时 IM 固体培养基的 pH 值对转化子的转化效率也有相当大的影响。当 IM 固体培养基的 pH 值为 5.3 时转化效率达到最高, 转化子可达到 252 个/10⁵ 个孢子左右, 而当 pH 5.0 或 6.1 时, 几乎没有转化子。由表 1 可以看出当 pH 值为 5.3 时转化效率达到最高, 显著高于 pH 5.4 及 5.2, 极显著高于 pH 5.2 及 5.5。

2.2 转化子 PCR 检测及荧光观察

对随机选取的 13 个转化子进行 PCR 扩增, 野生型 st89 及质粒 PCH-sGFP 分别作为阴性和阳性对照, 从图 8 可以看出, 随机挑选的 13 个转化子均可扩增出与载体大小一致的片段(712 bp), 说明这些转化子极有可能都是阳性克隆。将扩增后的 PCR 产物测序结果在 NCBI 进行 BLAST, 其与 *Hyg* 及 *GFP* 的基因序列一致性为 100% (图 9 和图 10), 证明 *GFP* 基因已成功转入棉花枯萎病菌中。

表 1 IM 培养基 pH 值对转化效率的影响
Table 1 Effect of pH value of IM medium on conversion efficiency

IM 培养基 pH pH value of IM medium	每 10 ⁵ 个孢子获得的转化子数 Number of transformants per 10 ⁵ spores	差异显著性 Significance of difference	
		$P<0.05$	$P<0.01$
5.0	7.33±1.45	f	E
5.1	47.67±8.74	e	D
5.2	176.67± 6.69	c	B
5.3	252.00±7.37	a	A
5.4	233.00±5.77	b	A
5.5	181.33±4.10	c	B
5.6	179.00±5.29	c	B
5.7	86.33±3.48	d	C
5.8	44.33±6.69	e	D
5.9	8.33±2.40	f	E
6.0	1.00±0.58	f	E

注: 字母均为差异显著性标记
Note: Letters are significant difference markers

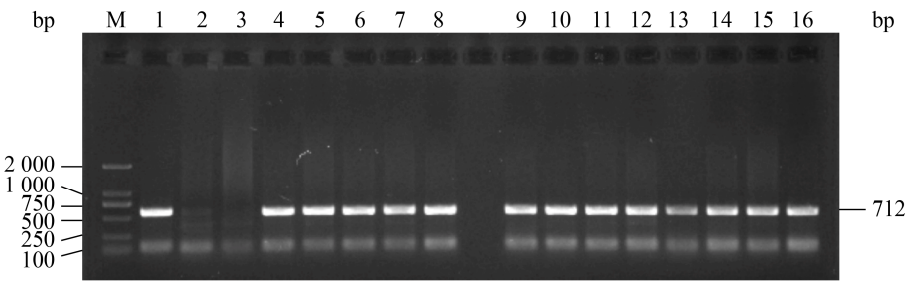


图 8 阳性转化子 PCR 鉴定结果

Figure 8 PCR identification results of positive inverters

注: M: 2000 DNA Marker; 1: 阳性对照质粒 PCH-sGFP; 2: 阴性对照野生型菌株 st89; 3: 清水对照; 4-16: 转化子
Note: M: 2000 DNA Marker; 1: Positive control PCH-sGFP; 2: Wild-type st89; 3: CK; 4-16: Transformants

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Synthetic construct clone pLH334 hygromycin B resistance protein (hph) gene complete cds	synthetic const...	1208	1208	100%	0.0	100.00%	1497	MK773641.1
✓	Cloning vector pLH331 complete sequence	Cloning vector...	1208	1208	100%	0.0	100.00%	8334	MG891792.1
✓	Cloning vector pLH334 complete sequence	Cloning vector...	1208	1208	100%	0.0	100.00%	9089	MG891791.1
✓	Cloning vector pTH1256.1 complete sequence	Cloning vector...	1208	1208	100%	0.0	100.00%	8251	MH550659.1
✓	Expression vector pOEHyg complete sequence	Expression ve...	1208	1208	100%	0.0	100.00%	10257	KU743913.1
✓	Binary vector pGOF1 complete sequence	Binary vector...	1208	1208	100%	0.0	100.00%	9087	KT599262.1
✓	Neurospora cloning vector pTH1124.1 complete sequence	Neurospora cl...	1208	1208	100%	0.0	100.00%	6586	JF749204.1
✓	Neurospora cloning vector pTH1123.1 complete sequence	Neurospora cl...	1208	1208	100%	0.0	100.00%	6796	JF749203.1
✓	Neurospora cloning vector pTH1117.12 complete sequence	Neurospora cl...	1208	1208	100%	0.0	100.00%	7048	JF749202.1
✓	Neurospora cloning vector pTH1112.8 complete sequence	Neurospora cl...	1208	1208	100%	0.0	100.00%	6367	JF749201.1
✓	Neurospora cloning vector pTH1111.1 complete sequence	Neurospora cl...	1208	1208	100%	0.0	100.00%	7308	JF749200.1

图 9 潮霉素 B 引物下转化子 PCR 产物序列在 NCBI 比对结果

Figure 9 PCR product sequences of inverters with hygromycin B primer were compared at NCBI

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Cloning vector pMSCV-syn-Gephyrin.FingR-GFP complete sequence	Cloning vector...	1044	1044	100%	0.0	100.00%	7231	MT612434.1
✓	Cloning vector pMSCV-syn-PSD95.FingR-GFP complete sequence	Cloning vector...	1044	1044	100%	0.0	100.00%	7231	MT612433.1
✓	Cloning vector pAAV-EF1A-Gephyrin.FingR-GFP-CCR5TC complete sequence	Cloning vector...	1044	1044	100%	0.0	100.00%	7010	MT612432.1
✓	Cloning vector pAAV-EF1A-DIO-Gephyrin.FingR-GFP-CCR5TC complete sequence	Cloning vector...	1044	1044	100%	0.0	100.00%	7204	MT612431.1
✓	Cloning vector pAAV-EF1A-PSD95.FingR-GFP-CCR5TC complete sequence	Cloning vector...	1044	1044	100%	0.0	100.00%	7204	MT612430.1
✓	Cloning vector pAAV-EF1A-PSD95.FingR-GFP-CCR5TC complete sequence	Cloning vector...	1044	1044	100%	0.0	100.00%	7010	MT612429.1
✓	Cloning vector pUAS_N_EGFP_BDattB complete sequence	Cloning vector...	1044	1044	100%	0.0	100.00%	8602	MN517551.1
✓	Cloning vector pUAS_C_eGFP_BDattB complete sequence	Cloning vector...	1044	1044	100%	0.0	100.00%	8690	MN517549.1
✓	Synthetic construct DWV-VDD-eGFP variant sequence	synthetic cons...	1044	1044	100%	0.0	100.00%	10917	MT415953.1
✓	Synthetic construct DWV-VDD-eGFP variant sequence	synthetic cons...	1044	1044	100%	0.0	100.00%	10917	MT415948.1
✓	Synthetic construct enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene partial cds	synthetic cons...	1044	1044	100%	0.0	100.00%	730	MN443913.1

图 10 GFP 引物下转化子 PCR 产物序列在 NCBI 比对结果

Figure 10 PCR product sequences of inverters with GFP primers were compared at NCBI

转化子在含有潮霉素 B 的 PDA 培养基中为白色, 在不含潮霉素 B 的 PDA 培养基中为紫色 (图 11)。分别挑取转化子和野生菌株菌丝制作临时玻片, 在荧光显微镜下观察结果表明, 野生

菌株的菌丝和分生孢子没有观察到任何荧光, 而转化子的菌丝和分生孢子均能发出稳定的绿色荧光 (图 12), 证明 *GFP* 基因已成功转入棉花枯萎病菌中。

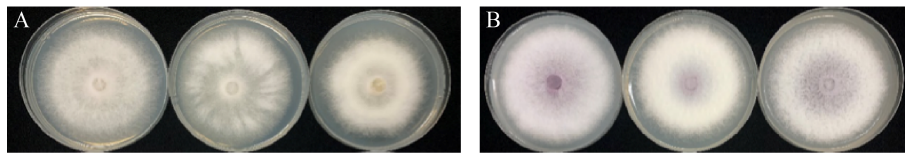


图 11 部分转化子形态图

Figure 11 Part of the transformants morphology

注: A: 含潮霉素 B 的 PDA 培养基; B: 不含潮霉素 B 的 PDA 培养基

Note: A: PDA medium containing hygromycin B; B: PDA medium without hygromycin B

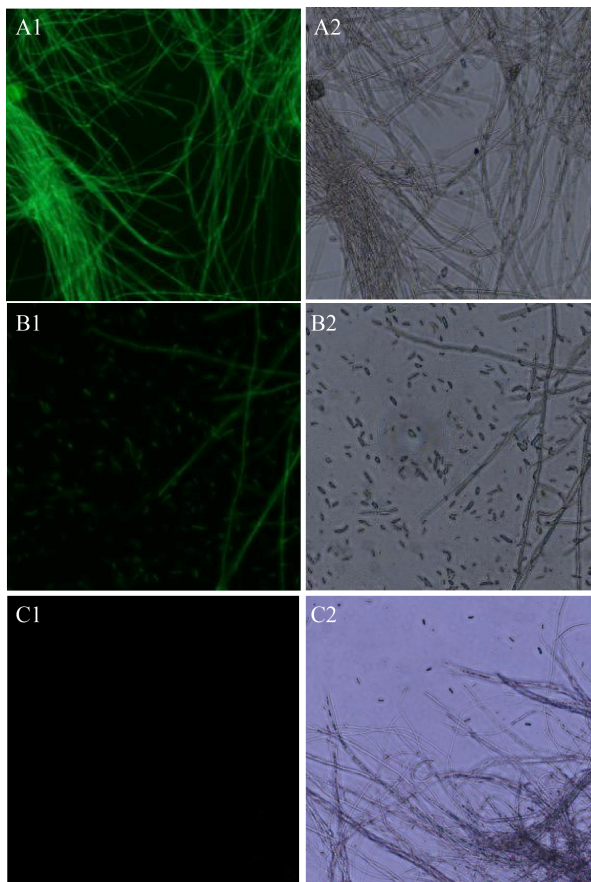


图 12 转化子连续继代培养 5 次后的荧光鉴定

Figure 12 Fluorescence identification of transformant after 5 consecutive subcultures

注: A1: 转化子菌丝在 488 nm 的波长下视野(200×); A2: 明场视野(200×)。B1: 转化子分生孢子在 488 nm 的波长下视野(200×); B2: 明场视野(200×)。C1: 野生型菌丝及分生孢子在 488 nm 的波长下视野(200×); C2: 明场视野(200×)

Notes: A1: Mycelium of transformants in the field of view at 488 nm (200×); A2: Bright field (200×). B1: Conidia of transformants in the field of view at 488 nm (200×); B2: Bright field (200×). C1: Mycelium and conidia of wild type in the field of view at 488 nm (200×); C2: Bright field (200×)

3 讨论与结论

ATMT 法是丝状真菌遗传转化的一种有效方法, 现已利用 ATMT 实现了多种丝状真菌的遗传转化^[19], 虽然转化步骤上没有太大差异, 但是对于不同真菌最佳转化条件的要求却有很大区别, 转化效率高低与多种因素有关, 如: 农杆菌浓度、孢子悬浮液浓度、农杆菌和真菌孢子的比例、诱导和共培养阶段的时间长度、AS 浓度、温度以及共培养介质等因素有关^[20]。

就潮霉素的使用浓度而言, 侯甲男等^[14]完全抑制棉花尖孢镰刀菌的潮霉素 B 最低浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$; 肖荣凤等^[21]发现完全抑制西瓜尖孢镰刀菌的潮霉素浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 。本研究发现抑制枯萎病菌生长的潮霉素浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 。

多数研究表明 AS 在农杆菌与受体材料共培养期间是不可缺少的, 不加 AS 诱导就不能获得转化子且随着 AS 浓度的增加转化子数目也明显增加^[22]。同时有研究表明若期望得到高比例单拷贝的转化子, 共培养时 AS 浓度不宜太高^[23]。本研究表明, AS 浓度在 0–200 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 农杆菌 LBA4404 浓度对棉花枯萎病菌的转化效率呈正相关, 若 AS 浓度增加到 300 $\mu\text{mol/L}$ 时, 转化效率显著降低。

在 AGL-1 转化 *Penicillium digitatum* 过程中发现, 当孢子浓度低于 10^4 个/mL 会严重影响转化效率^[9]。本文发现当孢子浓度为 10^4 个/mL 时转化子数量为 182 个转化子/ 10^5 个孢子, 当孢子浓度为 10^5 个/mL 时转化子数量为 217.67 个转化子/ 10^5 个孢子, 但若继续增加孢子浓度, 转化子数量逐渐降低。

一般而言,共培养时间越长,所得到的转化子就越多^[24]。本文发现转化时间在 4 d 时棉花枯萎病菌的转化效率达到 247 个/10⁵ 孢子,4 d 后转化效率逐渐降低,这可能是由于 CM 平板中头孢的作用效果逐步下降而造成农杆菌严重污染,产生农杆菌斑干扰转化子的纯度和增加筛选转化子的难度,以及假阳性克隆的产生给转化子筛选带来难度。在农杆菌介导的其他真菌转化体系中也有类似现象发生^[25]。

此外,在本研究中发现,转化子在 PDA 培养基(含有潮霉素 B 150 µg/mL)进行初次继代培养一段时间后,其菌丝均为白色,但培养时间过长时平板中心区域呈现和未经转化的枯萎病菌一样的紫红色,经过第 2 次的继代培养不会出现紫红色。这可能是由于转化子的不稳定导致的,但经过 5 次继代的筛选,此现象不再出现,转化子在含有潮霉素的 PDA 上均为白色,因此多次继代筛选就显得尤为必要。

本研究对影响 ATMT 转化棉花枯萎病菌的条件进行了优化,转化效率达到 252±7.37 个/10⁵ 个孢子,为构建大规模的棉花枯萎病菌 ATMT 突变体库奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Feng J, Sun WJ, Shi LY, Ma C. Screening and sequencing of race special DNA fragments of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2000, 30(1): 35-41 (in Chinese)
冯洁, 孙文姬, 石磊岩, 马存. 我国棉花枯萎菌生理小种特异性 DNA 扩增片段的筛选及序列测定[J]. 植物病理学报, 2000, 30(1): 35-41
- [2] Feng J, Sun WJ, Shi LY, Ma C. RAPD analysis of physiologic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in China[J]. Acta Gossypii Sinica, 1999, 11(5): 230-234 (in Chinese)
冯洁, 孙文姬, 石磊岩, 马存. 棉花枯萎病菌生理小种的分子指纹分析[J]. 棉花学报, 1999, 11(5): 230-234
- [3] Shi LY. Studies on the pathogen of *Fusarium vasinfectum* and *Verticillium dahliae* of cotton[J]. Acta Gossypii Sinica, 1996, 8(6): 292-294 (in Chinese)
石磊岩. 中国棉花枯、黄萎病原菌研究[J]. 棉花学报, 1996, 8(6): 292-294
- [4] Yu SX, Fan SL, Wang HT, Wei HL, Pang CY. Progresses in research on cotton high yield breeding in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(18): 3465-3476 (in Chinese)
喻树迅, 范术丽, 王寒涛, 魏恒玲, 庞朝友. 中国棉花高产育种研究进展[J]. 中国农业科学, 2016, 49(18): 3465-3476
- [5] Liu DM. Research of culture condition on cotton *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2016, 22(4): 108-111 (in Chinese)
刘冬梅. 棉花枯萎病菌培养条件的研究[J]. 天津农业科学, 2016, 22(4): 108-111
- [6] Gao H. Identification and pathogenicity of the suspected Australian strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2014 (in Chinese)
高慧. 棉花枯萎菌疑似澳大利亚菌株的鉴定及致病力分析[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2014
- [7] Zhou QX. Establishment of transformation systems for filamentous fungi[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2007 (in Chinese)
周庆新. 丝状真菌遗传转化系统的建立[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2007
- [8] Xu MM, Su QF, Li LN, Qu Q, Jia J, Cao ZY, Dong JG. Construction of CFP-labeled *Fusarium graminearum* transformants[J]. Microbiology China, 2018, 45(10): 2191-2199 (in Chinese)
许苗苗, 苏前富, 李丽娜, 渠清, 贾娇, 曹志艳, 董金皋. 青色荧光蛋白标记的禾谷镰孢转化子的构建[J]. 微生物学通报, 2018, 45(10): 2191-2199
- [9] Huang YL. The optimization of *Agrobacterium tumefaciens* mediated *Trichoderma harzianum* transformation system and analysis of T-DNA insertional mutants[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008 (in Chinese)
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
- [10] Wang MJ, Li P, Wu M, Fan YS, Gu SQ, Dong JG. Constuction and evaluation of ATMT mutant library of *Setosphaeria turcica*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(12): 2384-2392 (in Chinese)
王梅娟, 李坡, 吴敏, 范永山, 谷守芹, 董金皋. 玉米大斑病菌 ATMT 突变体库的构建及其分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(12): 2384-2392
- [11] Li CQ, Liang HS, Xia YJ, Peng M. Observation of the infection process of watermelon by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* using the GFP marker[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(10): 1935-1939 (in Chinese)
李春强, 梁慧施, 夏亦芥, 彭明. GFP 标记的尖孢镰刀菌西瓜专化型侵染西瓜过程观察[J]. 热带作物学报, 2011, 32(10): 1935-1939

- [12] Lv GY, Guo SG, Zhang HY, Geng LH, Xu Y. Study on the infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* by GFP marker[A]//Proceedings of the 2012 Annual Conference of the Chinese Academy of Horticulture[C]. Yangling, 2012: 159 (in Chinese)
吕桂云, 郭绍贵, 张海英, 耿丽华, 许勇. 用 GFP 标记法研究西瓜枯萎病菌的侵染过程[A]//中国园艺学会 2012 年学术年会论文集[C]. 杨凌, 2012: 159
- [13] Liang S, Chang GZ, Zhao WX, Yang LR, Sun H, Li XH, Yang F, Quan X, Xu XL, Xue BG. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and screening of mutants with special traits[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2012, 41(1): 82-86 (in Chinese)
梁慎, 常高正, 赵卫星, 杨丽荣, 孙虎, 李晓慧, 杨帆, 全鑫, 徐小利, 薛保国. 农杆菌介导尖孢镰刀菌西瓜专化型转化体系的建立及突变体筛选[J]. 河南农业科学, 2012, 41(1): 82-86
- [14] Hou JN, Li W, Yang XJ, Sun Y, Xie DY, Wang MM, Fang WP, Zhao FA. Transformation of green fluorescent protein in *Fusarium oxysporum* of cotton[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(10): 3247-3252 (in Chinese)
侯甲男, 李武, 杨晓杰, 孙瑶, 谢德意, 汪蒙蒙, 房卫平, 赵付安. 棉花尖孢镰刀菌绿色荧光蛋白的转化[J]. 分子植物育种, 2019, 17(10): 3247-3252
- [15] Li JX. Pathogen identification and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Corynespora cassiicola* from muskmelon[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese)
李俊香. 甜瓜棒孢叶斑病菌鉴定及农杆菌介导的遗传转化体系建立[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2019
- [16] Chen TZ, Yuan HB, Yang YW, Liu AM, Zhang BL. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Verticillium dahliae*[J]. Cotton Science, 2011, 23(6): 507-514 (in Chinese)
陈天子, 袁洪波, 杨郁文, 刘嵩民, 张保龙. 农杆菌介导转化大丽轮枝菌的体系优化[J]. 棉花学报, 2011, 23(6): 507-514
- [17] Luo ZQ, Cheng L, Zhang X, Chen GH. A rapid method of preparing DNA template of filamentous fungi for PCR amplification[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(9): 79-83 (in Chinese)
罗中钦, 程琳, 张茜, 陈国华. 丝状真菌 PCR 模板 DNA 的快速制备方法[J]. 生物技术通报, 2015, 31(9): 79-83
- [18] Fan LB, Li M, Ji Y, Liu WD, Jiang XL. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and its application in *Trichoderma* spp.[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(3): 1-5,12 (in Chinese)
范亮波, 李梅, 冀颖, 刘卫德, 蒋细良. 根癌农杆菌介导的木霉遗传转化及应用进展[J]. 生物技术通报, 2010(3): 1-5,12
- [19] Gu XY, Shi WX, Wang HK, Guo QY. Development of the *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system of *Alternaria alternata* apple pathotype[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(10): 1885-1891 (in Chinese)
顾雪迎, 施文骁, 王洪凯, 郭庆元. 链格孢菌苹果致病型的 ATMT 转化体系的建立[J]. 中国农业科学, 2016, 49(10): 1885-1891
- [20] Liu YQ, Li C, Xu XD, Liu FF, Yu L. Marking of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* with green fluorescent protein (GFP) and measurement of its stability[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2013, 35(1): 15-18 (in Chinese)
刘勇勤, 李赤, 徐秀德, 刘菲菲, 于莉. 利用绿色荧光蛋白(GFP)标记香蕉枯萎病菌及其稳定性检测[J]. 吉林农业大学学报, 2013, 35(1): 15-18
- [21] Xiao RF, Zhu YJ, Li YD, Huang SF, Liu B. Green fluorescent protein gene transformation on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* strain, FOV-135[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2009, 24(6): 521-524 (in Chinese)
肖荣凤, 朱育菁, 李燕丹, 黄素芳, 刘波. 西瓜尖孢镰刀菌 FOV-135 的绿色荧光蛋白基因转化[J]. 福建农业学报, 2009, 24(6): 521-524
- [22] Chen DL, Li JY, Fan ZQ, Fan MH. Influencing factors of genetic transformation in fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and its application[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(7): 3317-3320 (in Chinese)
陈东亮, 李纪元, 范正琪, 范妙华. 根癌农杆菌介导真菌遗传转化的影响因素及应用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(7): 3317-3320
- [23] Zhang YH. The study of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated T-DNA insertional mutagenesis in *Sporothrix schenckii*[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2011 (in Chinese)
张艳华. 根癌农杆菌介导申克氏孢子丝菌 T-DNA 插入突变的研究[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2011
- [24] Fan L, Zhang J, Yang L, Li GQ. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Botrytis cinerea* strain RoseBc-3[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2013, 32(2): 30-35 (in Chinese)
范雷, 张静, 杨龙, 李国庆. 农杆菌介导灰葡萄孢菌株 RoseBc-3 的遗传转化[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(2): 30-35
- [25] Deng DJ, Meng YN, Deng EJ, Dong JG, Zeng FL. Application of genetic selection system in filamentous fungi: a review[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 1165-1178 (in Chinese)
邓大杰, 孟亚南, 邓二杰, 董金皋, 曾凡力. 丝状真菌遗传筛选系统的研究及其应用[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1165-1178