

哈茨木霉厚垣孢子产生突变体的筛选 及 T-DNA 标签序列的克隆

黄亚丽^{1,2}, 蒋细良³, 田云龙², 朱昌雄²

(1. 河北省生物研究所, 河北 石家庄 050081; 2. 中国农业科学院 环发所, 北京 100081; 3. 中国农业科学院 植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 利用 PD 液体培养基从哈茨木霉 T-DNA 插入突变体库中筛选出在产孢性状上与野生型菌株明显不同突变子 7 株, 其突变表型主要表现在分生孢子产生数量显著减少和菌丝上有大量厚垣孢子分化。利用 TAIL-PCR 方法对 7 株突变体的侧翼序列进行克隆, 从 5 个突变体中获取了 5 条 T-DNA 侧翼序列。为木霉厚垣孢子产生相关全长基因的克隆和产孢机制的研究奠定了基础。

关键词: 哈茨木霉; T-DNA; 突变子; TAIL-PCR; 厚垣孢子

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)05-0035-05

Study on Screening of Chlamydospore Formation Mutants from T-DNA Insertional Mutant Library of *Trichoderma* *harzianum* and Cloning of T-DNA Tagging Sequence

HUANG Ya-li^{1,2}, JIANG Xi-liang³, TIAN Yun-long², ZHU Chang-xiong²

(1. Biological Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050081, China; 2. Institute of Agricultural Environment and Sustainable Development, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China; 3. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: 7 mutants with chlamydospore formation differences were selected from 1 192 transformants cultured in PD liquid medium. The conidia formation ability of all these 7 mutants was significantly lower than that of the wild type *T. harzianum*. The characterization of these 7 mutants was analyzed. The results showed that as for the mutants 918, 1 137, 1 317 chlamydospore developed in the mycelium and falled off from mycelium when incubated time prolonged. However, as for the other 4 mutants 627, 840, 1 137, 1 173 the chlamydospore couldn't falled off from mycelium when incubated time prolonged. Using TAIL-PCR to clone T-DNA right border sequences from spore formation mutants, we successfully obtained the fungal genomic DNA sequences flanking T-DNA right border from 5 transformants. The homologous sequences of 3 sequences were found by using Blastn and Blastx from NCBI GenBank. However, the homologous sequences of other 2 sequences were not found. They might be new genes related to spore formation which need to be further studied. This study is the base for the cloning of chlamydospore related gene and the mechanism research of chlamydospore formation.

Key words: *Trichoderma harzianum*; T-DNA; Mutant; TAIL-PCR; Chlamydospore

木霉(*Trichoderma* spp.) 是一种重要的生防真菌, 研究表明该菌对 18 个属的 30 多种植物病原菌具有拮抗作用^[1], 在植物病害生物防治领域占有重

要地位, 已经开发出了 50 多种木霉菌剂^[2]。由于木霉培养过程中很容易产生大量分生孢子, 所以目前木霉菌剂 80% 以上为分生孢子制剂。然而分生孢

收稿日期: 2009-07-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671400); “十一五”支撑项目(2006BAD08A02); “863”项目(2006AA10A211)

作者简介: 黄亚丽(1975-), 女, 河北肃宁人, 副研究员, 博士, 主要从事植物病害的生物防治研究。

通讯作者: 朱昌雄(1963-), 男, 福建福安人, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事生物防治研究。

子抗逆能力低的缺点, 导致了木霉制剂在货架期和田间生防效果稳定性等方面存在一定的缺陷。厚垣孢子是木霉在逆境条件下产生的一种繁殖体, 对光、温、湿等条件具有广泛适应性, 研究发现以厚垣孢子为有效成分的木霉制剂其田间应用效果显著高于分生孢子制剂^[3], 然而厚垣孢子的难培养性却限制了在木霉制剂中的应用。因此, 利用功能基因组学的方法从基因水平分析木霉厚垣孢子产生机制是非常必要的, 木霉厚垣孢子产生分子机制的明确对生防木霉菌株的筛选及改良、生产工艺、制剂开发、田间应用技术等都具有重要理论意义和潜在的应用价值。

通过基因插入失活获得覆盖全基因组的突变体库是功能基因组学研究的基础性工作, 而随后失活基因的分离也非常关键。农杆菌介导转化法(*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation, ATMT)是建立覆盖基因组突变体库的有效方法^[4,5], 热不对称 PCR (Thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR) 是用来分离已知 DNA 序列侧翼未知序列的高效技术^[6]。本课题组利用 ATMT 方法建立了含有 1 万多个哈茨木霉突变子的 T-DNA 插入突变体库, 对突变体库中突变子性质研究发现 80% 以上的突变子是由于 T-DNA 的单拷贝、随机插入引起的。本研究以此为基础, 利用 PD 液体培养基对库中的突变子进行厚垣孢子产生突变体的筛选, 并利用 TAIL-

PCR 技术对筛选出的突变体的 T-DNA 侧翼序列进行克隆, 为下一步与厚垣孢子产生相关基因全长序列的克隆及功能验证奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

哈茨木霉菌 Th-33 的 T-DNA 插入突变体库, 由本实验室建立和保存。TAIL-PCR 特异引物根据已知 T-DNA 序列右边界设计的 3 个特异性巢式引物, sp-1: 5'-GGC CGT GGT TGG CTT GTA TGG AGC AGC AGA-3'; sp-2: 5'-TGG TCT TGA CCA ACT CTA TCA GAG CTT GGT-3'; sp-3: 5'-TCTGGACCGATGGCTGTGTAGAACTA CTCG-3'; TAIL-PCR 随机引物为高简并引物 AD5: 5'-AGC WGN AGW ANC AWA GG-3'。

1.2 方法

1.2.1 哈茨木霉 T-DNA 插入突变体库中厚垣孢子产生突变体的筛选 挑取保存的转化子接种到 PDA 选择性培养基上^[7], 28℃培养 4~ 7 d, 用 5 mL 灭菌水冲洗菌落表面, 吸取 1 mL 孢子液接种到装量为 50 mL PD 培养基的 250 mL 三角瓶内, 28℃培养 3 d, 期间观察发酵液的颜色变化并镜检转化子菌丝和孢子的生长情况, 用显微成像系统照相, 记录发生变异的菌株。以野生型哈茨木霉菌株为对照。

1.2.2 哈茨木霉突变株基因组 DNA 的提取 利用

表 1 TAIL-PCR 的反应程序和反应体系

Tab. 1 Cycling conditions and the reaction component used for TAIL-PCR

反应 Reaction	循环数 Circle number	扩增条件 Amplification conditions	反应成分 Reaction component	加量/ μ L Addition amount
第 1 轮 First circle	1	94℃, 1 min; 95℃, 1 min		
	5	94℃, 20 s; 65℃, 5 s; 74℃, 30 s	10× PCR Buffer	2.0
	1	94℃, 20 s; 30℃, 30 s; 41℃, 55 s	2.5 mmol/L dNTPs	2.0
	13	Ramping to 72℃ over 3 mins 72℃ 2.5 min	SP-1	0.5
		94℃, 20 s; 68℃, 5 s; 74℃, 30 s	AD 引物	2.0
		94℃, 20 s; 68℃, 5 s; 74℃, 30 s	DNA 模板	1
		94℃, 20 s; 44℃, 5 s; 74℃, 30 s	<i>Taq</i> 酶	0.3
			ddH ₂ O	12.2
	1	74℃, 8 min		
第 2 轮 Second circle	1	94℃, 1 min; 95℃, 1 min	10× PCR Buffer	2.5
	10	94℃, 20 s; 68℃, 5 s; 74℃, 30 s	2.5 mmol/L dNTPs	2.0
		94℃, 20 s; 68℃, 5 s; 74℃, 30 s	SP-2	1
		94℃, 20 s; 44℃, 5 s; 74℃, 30 s	AD	2
			DNA 模板	1
	1		<i>Taq</i> 酶	0.4
			ddH ₂ O	12.2
第 3 轮 Third circle		94℃, 1 min; 95℃, 1 min	10× PCR Buffer	5
	1	94℃, 20 s; 68℃, 5 s; 74℃, 30 s	2.5 mmol/L dNTPs	4
	10	94℃, 20 s; 68℃, 5 s; 74℃, 30 s	SP-3	2
		94℃, 20 s; 44℃, 5 s; 74℃, 30 s	AD	3
			DNA 模板	2
	1		<i>Taq</i> 酶	1
			ddH ₂ O	33

北京天根生物公司的植物基因组提取试剂盒提取突变子的基因组 DNA。

1.2.3 厚垣孢子产生突变体中T-DNA 插入侧翼序列的扩增 以 sp1、sp2、sp3 为特异引物,以 AD5 为随机引物,对基因组 DNA 进行 TAIL-PCR 扩增。扩增体系和程序见表 1。其中第 1 轮 PCR 的 DNA 模板为突变子的基因组 DNA,第 2 轮和第 3 轮 PCR 以其前一轮产物的 100 倍稀释液为模板。

1.2.4 TAIL-PCR 扩增产物的测序 TAIL-PCR 的第 3 轮 PCR 产物与 T 载体 pDM18-T 连接后转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,利用蓝白斑法筛选阳性克隆,取 3 个白斑和 1 个蓝斑做菌体 PCR,检测克隆中是否有所需片段,将阳性克隆送北京三博远志生物公司进行测序。利用 Blast 软件对 T-DNA 插入侧翼序列与 Genbank 数据库中的数据库进行比对分析,分析

突变序列的功能。

2 结果与分析

2.1 哈茨木霉 Th-33 在 PD 培养基中的生长状况

对哈茨木霉 Th-33 培养观察发现(图 1),哈茨木霉在 PD 培养基中培养 12 h,90% 以上的孢子都已经萌发;24 h 之后菌丝已有多级分支,PD 培养液变稠;36 h 时菌丝顶端大部分分化出分生孢子器,菌液中有少量的分生孢子,此时的木霉培养液呈现浅绿色;48 h 时,镜检观察发现培养液中已密布分生孢子,分生孢子浓度约为 10^8 个木霉孢子/mL,菌液呈现暗绿色。在该培养过程中,哈茨木霉的生长是由一个分生孢子萌发长成菌丝、菌丝顶端分化出分生孢子器、分生孢子器再长出分生孢子的过程,不涉及厚垣孢子的分化和产生过程。

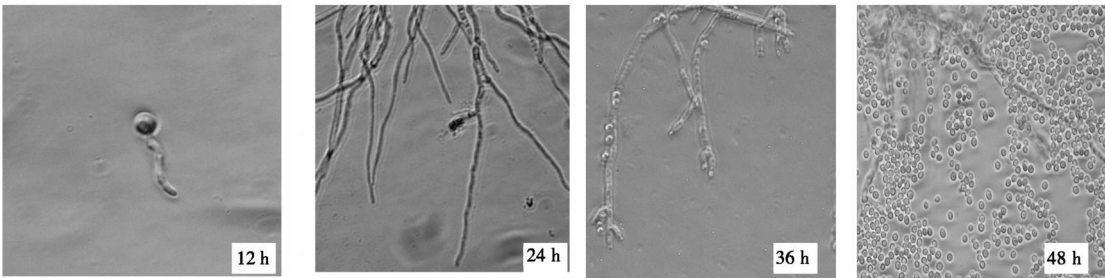


图 1 哈茨木霉 Th-33 在 PD 培养基中不同培养时间的生长状态(× 400)

Fig.1 The growth conditon of *T. harzianum* Th-33 in PD medium(× 400)

表 2 孢子产生突变子的培养特征(28℃ 培养 60 h)

Tab.2 The cultural characteristics of conidia formation mutants (incubation for 60 h at 28℃)

转化子编号 Mutant serial number	培养液颜色 Color of culture liquids	分生孢子产生数目 (个/mL) Number of conidia	厚垣孢子分化情况 Chlamyospore differentiation condition	厚垣孢子脱落情况 Chlamyospore exfoliated condition
哈茨木霉 Th-33 (<i>T. harzianum</i>)	墨绿色	10^8	无	—
627	黄白色	10^3	有	不脱落
840	黄 色	4×10^3	有	不脱落
918	黄 色	8×10^4	有	脱 落
1137	黄褐色	2×10^4	有	脱 落
1173	黄 色	2×10^4	有	不脱落
1317	黄褐色	2×10^6	有	脱 落
1373	黄 色	3×10^4	有	不脱落

2.2 厚垣孢子产生突变子的的生长状况

以野生型哈茨木霉为对照,对突变子在 PD 培养基中的生长情况进行显微镜观察,在 1 192 株突变子中发现了 7 株突变子其分生孢子产生量减少(降低为野生型分生孢子数量的 $1/10^4\sim 1/10^5$),同时有大量厚垣孢子分化(表 2)。对有厚垣孢子分化的菌株进一步培养,发现其中 3 株突变子分化的厚垣孢子随着培养时间延长从菌丝上脱落下来(图 2-A);另外 4 株虽能够在菌丝顶端或中间分化出大量厚垣孢子但摇床培养至 7 d 也不能从菌丝上脱落下来(图 2-B) 由突变表型观察说明,T-DNA 有可能

是插入到了不同的基因序列之上,从而引起了不同程度的变异。

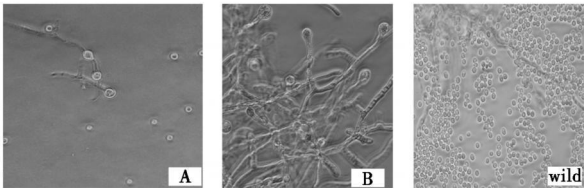


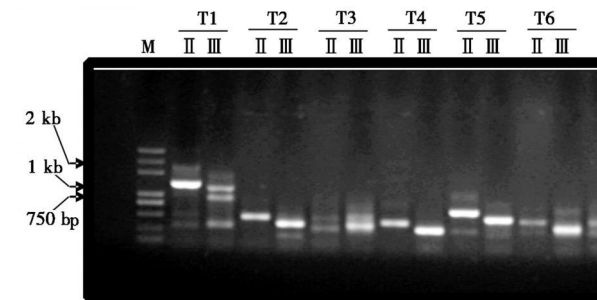
图 2 厚垣孢子产生突变体的显微镜观察状态
(28℃ 培养 60 h)(× 400)

Fig.2 The hyphae morphology of the conidia formation mutants under the microscope(incubation for 60 h at 28℃)

2.3 厚垣孢子产生突变子 T-DNA 标签序列的 TAIL-PCR 克隆

2.3.1 T-DNA 插入侧翼未知序列的分离和测序

在 1% 琼脂糖凝胶上各取适量 TAIL-PCR 第 2 轮及第 3 轮扩增产物电泳, 由电泳图谱可以看出第 3 轮 PCR 产物大都出现很强的特异性条带, 而且与第 2 轮产物表现出合理的预期嵌套长度梯度。经过多次 TAIL-PCR, 7 株突变体中有 6 株得到了第 3 轮阳性产物 (图 3)。对第 3 轮 PCR 产物电泳回收合理条带后, 分别与 T 载体 p DM18-T 连接、克隆, 并挑取阳性克隆进行测序。



T1、T2、T3、T4、T5、T6 分别代表不同的厚垣孢子产生突变体;
II、III 代表 TAIL-PCR 的第 2 轮和第 3 轮。

T1, T2, T3, T4, T5, T6 means different chlamydospore formation mutants;
II, III means the second cycle and third cycle of TAIL-PCR.

图 3 厚垣孢子产生突变体 TAIL-PCR 第 2 轮、第 3 轮
扩增结果电泳图

Fig. 3 Electrophoresis patterns of chlamydospore
transformants' second and third round TAIL-PCR product

2.3.2 TAIL-PCR 扩增序列的分析及功能比对 对 TAIL-PCR 扩增的序列进行分析发现, 6 条测序序列中有 5 条为有效序列, 包括第 3 轮的特异引物 $sp-3$ 、T-DNA 区域、完整或部分缺失的 T-DNA 边界以及扩增出的哈茨木霉基因组序列。利用 Blast 软件对所扩增出的哈茨木霉基因组片段与 Genbank 中数据库比对发现, 5 个基因中 3 个分别与细胞分裂膜蛋白、FMN 结合蛋白、与 ABC 类型的氨基酸转运信号诱导系统相关的蛋白, 而另外 2 个没有找到相关的同源序列, 有可能是未知功能基因。

3 讨论

功能基因组学的研究迫切需要了解基因组时代所释放的大量未知基因的功能, 建立覆盖基因组的突变体库是研究功能基因的重要前提。哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 在植物病害的防治过程中表现出的优良性状激发着越来越多的科技工作者对其功能基因进行探索, 而找出与功能基因相应的突变表型是研究关键基因功能、解决木霉菌剂现有的缺陷所必要的。但迄今为止, 木霉菌基因的功能大部

分是假定的, 缺乏试验证据。反向遗传学的方法是获得功能基因的直接方法, 其过程是从突变体库中筛选具有特殊表型的突变体, 然后扩增出突变的基因组序列、最后利用表型互补等方法对其功能进行进一步验证。因此, 利用反向遗传学方法进行木霉功能基因的研究具有重要的意义。

分生孢子和厚垣孢子是木霉菌以及多种丝状真菌在生长过程中产生的繁殖体, 对这两种孢子产生的分子机制进行研究对了解病原微生物的繁殖侵染以及生防微生物的防病方面都具有重要的作用。对分生孢子产生机制的研究较早, 对曲霉的分生孢子途径研究最深入, 研究发现分生孢子是由分生孢子梗连续有丝分裂产生的, 这一过程是由特定的分生孢子基因控制, 相关基因包括 *brlA*、*abaA*、*wetA*、*medA*、*StuA* 等。其中 *brlA*、*abaA*、*wetA* 构成了分生孢子产生调控的核心序列, *brlA* 在产孢初期表达, *abaA* 与分生孢子梗的分化相关, *wetA* 基因则调控着分生孢子的成熟^[8]。利用 REMI 建立了尖孢镰刀菌突变子库, 从中挑选出了一个分生孢子缺陷型菌株, 该菌株不能产生大小分生孢子, 仅产生向顶生长成串分生孢子样式的细胞, 但其营养生长与厚垣孢子产生不受影响。Ohara 等^[9] 对该突变子进行了深入分析, 利用质粒拯救的方法获得了基因 *REN1*, 并证明该基因与尖孢镰刀菌大小分生孢子产生相关。但直到目前为止, 还没有进行哈茨木霉厚垣孢子产生相关基因的报道, 对该空白的研究具有重要的实际应用和理论意义。

本研究以前期建立的哈茨木霉 T-DNA 插入突变体库为基础, 利用 PD 培养基对突变子库中的转化子进行了孢子产生突变子筛选, 筛选出在产孢性能方面发生变异的突变株, 观测结果表明在分生孢子和厚垣孢子产生方面的突变表型是多种多样的, 包括分生孢子产生提前型、分生孢子产生延后型、分生孢子产生减少、无厚垣孢子产生、分生孢子产生减少-有厚垣孢子产生等多种。这种多样性的突变表型表明了产孢过程的复杂性和多基因控制性。

在此对有厚垣孢子分化的突变子进行详细分类, 发现具有厚垣孢子产生的突变株其分生孢子产生数量就显著减少, 表明分生孢子和厚垣孢子产生有可能存在一定联系的, 可能有一组基因调控着分生孢子和厚垣孢子的产生, 关闭或减少了分生孢子的产生过程, 同时启动了厚垣孢子的产生过程。当然, 厚垣孢子的产生也是一个复杂的过程, 对筛选出的厚垣孢子突变体分析可知, 所有的转化子都能分化出厚垣孢子, 然而只有 3 个转化子的厚垣孢子能

够从菌丝上脱落下来, 这说明厚垣孢子的成熟脱落也有特定基因的调控。这些分析仅是基于推测的基础上, 还需要采用表型互补等方法对克隆出的基因进行进一步验证。

扩增已知 DNA 序列侧翼未知序列的方法很多, 比如质粒拯救、反向 PCR、载体 PCR 等方法, 但是这些方法在反应前必须作酶切、连接、加尾等一系列繁琐的操作。TAIL-PCR 方法是 Liu 等^[6]首先建立的, 该方法通过三轮 PCR 能够快速分离到目标序列, 具有简单、特异性高、灵敏度高、快速、不涉及连接反应等优点, 对基因克隆研究具有重要的意义, 目前已经在基因克隆上得到了广泛应用。然而, TAIL-PCR 方法也具有一定缺陷, 如不是每次反应都有阳性结果, 对不同真菌 T-DNA 标签的侧翼序列分离时, 使用不同的 AD 引物效果不同, 因此有必要对 AD 引物进行优化。本试验前期共采用了 12 个随机简并引物, 对 50 多个突变子进行了多次 TAIL-PCR 研究发现, 其中 AD5 引物的扩增效率最高, 约为 80% 左右。因此, 本研究以 AD5 为随机引物对 7 个厚垣孢子突变体的 T-DNA 侧翼序列进行扩增, 成功得到了 5 个侧翼序列。这些序列的获得对厚垣孢子产生相关全长基因的克隆奠定了基础, 对哈茨木霉厚垣孢子制剂的开发具有理论意义。

参考文献:

[1] 惠有为, 孙 勇, 潘亚妮, 等. 木霉在植物真菌病害防治

上的应用[J]. 西北农业学报, 2003, 12(3): 96– 99.

- [2] 陈 捷. 木霉菌在植物病害生物防治中的作用机理研究进展[C]//杨怀文. 迈入二十一世纪的中国生物防治. 北京: 北京中国农业科学技术出版社, 2005: 70– 75.
- [3] 潘 玮. 绿色木霉菌厚垣孢子与分生孢子生物学特性及生物防效的比较研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
- [4] Sugui J A. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 1798– 1802.
- [5] Bundock P, den Dulk-Ras A, Beijersbergen A. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. EMBO J, 1995, 14: 3206– 3208.
- [6] Liu Y G, Mitsukawa N, Oosumi T. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR[J]. The Plant Journal, 1995, 8(3): 457– 463.
- [7] 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.
- [8] Timberlake W E. Molecular genetics of *Aspergillus* development[J]. Annu Rev Genet, 1990, 24: 5– 36.
- [9] Ohara T, Inoue I, Namiki F, et al. REN1 is required for development of microconidia and Macroconidia, but not of chlamydospores, in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*[J]. Genetics, 2004, 166: 113– 124.