

抑制稗草生长的木霉菌 REM 转化子构建与功能初探

李薇^{1,2}, 王兵, 陈云鹏, 刘力行, 徐书法, 陈捷*

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁沈阳 110161; 2. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101)

摘要 创制新的木霉菌突变株, 为筛选新的抑草类化合物奠定基础。通过 REM 插入突变技术, 以 *Trichoderma atroviride* T23 为出发菌, 进行了 REM 转化子构建。对得到的转化子进行了 PCR 检测, 分别利用抗潮霉素和氨苄青霉素基因为引物进行特异性扩增, 并对发酵产物细分为分生孢子、超声波 PBS 法破碎孢子和发酵液, 分别对稗草生长的生物活性进行测试。获得了 18 个转化子, 通过继代培养和 PCR 扩增, 证明线性 pV2 质粒 DNA 已成功插入木霉菌基因组。从 REM 创制的木霉菌突变株库中, 筛选出 8 株有抑草活性转化子 TaA2、TaB3、TaB7、TaE2、TaE8、TaH8、TaJ6 和 TaJ9, 其发酵液具有抑制稗草的活性, 并对水稻生长安全。经测试发酵产物对稗草生长的生物活性, 获得了具有抑草活性及稳定性均理想的转化子 TaB3。REM 方法所创造的转化子可较高效地筛选出具有抑草功能的突变体。

关键词 木霉菌; REM; 抑草活性

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)21-06473-03

Preliminary Discussion on the Construction of REM Transformant of *Trichoderma* for Inhibiting the Growth of Barnyard Grass and its Function

LI Wei et al (College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract The aim of the research was to create new mutant strains of *Trichoderma* and lay the foundation for screening new weed-suppressive compounds. *Trichoderma atroviride* T23 was used as the original strain to construct REM transformant by REM insertional mutagenesis technology. Obtained transformants were detected by PCR to amplify specially by using the genes resistant to hygromycin and ampicillin as primers. And the fermented products were sub-divided into conidophore, crashed spores by ultrasonic PBS method and fermented liquid to test the biology activities of barnyard grass growth respectively. 18 transformants were obtained in this test. It was proved that linear pV2 plasmid DNA was inserted into *Trichoderma* genome successfully by subculture and PCR amplification. 8 transformants of weed-suppressive activity, including TaA2, TaB3, TaB7, TaE2, TaE8, TaH8, TaJ6 and TaJ9, were screened from mutant strains library of *Trichoderma* created by REM and the fermented liquid of weed-suppressive activity was safe to rice production. Transformant TaB3 with ideal weed-suppressive activity and stability was obtained by determining the biology activity of fermented products on the growth of barnyard grass. The transformant created by REM method could screen the mutants with weed-suppressive function efficiently.

Key words *Trichoderma*; REM; Weed-suppressive activity

随着人们对农业环境质量的日益重视, 筛选生物除草剂的研究已成为国内外农业有害生物无公害防治的重要领域。目前真菌除草剂的研究和开发最为活跃^[1]。自从 20 世纪 30 年代木霉菌(*Trichoderma*) 作为生物防治微生物进行研究与开发以来, 关于木霉菌与宿主植物互作的机理已有很多报道, 研究已经证实某些木霉菌的种类对宿主植物生长有明显的专化性抑制作用, 因此, 利用这一特性可为开发新一类生物除草剂提供新途径^[2]。据报道, 木霉菌某些种可产生二氢绿胶霉素衍生物, 二氢绿胶霉素是由绿胶霉素经酶催化后产生, 有非常弱的病原菌拮抗活性, 但有较强的除草活性^[3], 然而对木霉菌代谢物中是否还存在其他可能具有抑草活性的成分, 新的报道不多。因此, 笔者拟利用限制性内切酶介导的基因整合(REM) 技术, 创制新的木霉菌突变株, 为筛选新的抑草类化合物奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 木霉菌 T23(*Trichoderma atroviride*) 由实验室保存。质粒 pV2(5 080 bp), 由中国农业大学彭友良教授提供。

1.2 方法

1.2.1 REM 转化子构建。原生质体制备参考黄玉茜的方法^[4]。取 T23 原生质体溶液 100 μ l (10^7 个/ml) 于 50 ml 离心管中, 加入适量 pV2 和 Hnd 混合, 置于冰浴上 20~25 min。缓慢加入 1.5 ml 60% PEG, 冰浴 20~25 min 后加入 STC 4 ml,

混匀后离心 15 min (4℃, 2 000 r/min), 弃上清液, 向沉淀中加入 3 ml 液体再生培养基。将培养液倒入培养皿, 然后加入 15 ml 左右的固体培养基(50 g), 水平晃动使其混匀冷却。室温放置 6 h 后, 平铺上一层含有 300 μ g/ml 潮霉素的水琼脂。28℃ 培养 2~3 d 后, 挑取抗潮霉素的转化子转至含有 250 μ g/ml 潮霉素的 PDA 上进行二次筛选, 然后在 PDA 上继代培养 7 代后, 仍能在含 250 μ g/ml 潮霉素的 PDA 上正常生长的转化子确认为是稳定的转化子。

1.2.2 转化子 PCR 检测。基因组 DNA 提取参考 CTAB 法^[5]。根据水解潮霉素和氨苄青霉素的基因序列, 设计以下 2 对引物, 水解潮霉素引物的核苷酸序列为 5'-GAGGCACC-TATCTCAGCG-3' 和 5'-GTGTCGCCCTTATTCCT-3'; 水解氨苄青霉素引物的核苷酸序列为 5'-GGCGAAGAATCTCGTGCITTC-3' 和 5'-CAGGACATTGTTGGAGCCGAAA-3'。PCR 反应体系为 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ l, 10 \times buffer 2 μ l, dNTP 0.5 μ l, Taq 酶 0.2 μ l, DNA 模板 1 μ l, 引物 1 μ l, 加灭菌 ddH₂O 补足 25 μ l。扩增条件为: 95℃ 3 min 变性; 一个循环为 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共进行 35 个循环; 72℃ 10 min DNA 合成。另外设立 PCR 反应的阳性(pV2)、阴性(T23)及 ddH₂O 作为对照。

1.2.3 REM 转化子发酵液抑制稗草活性测定(初筛试验)。初筛方法见参考文献[6]。

1.2.4 复筛。在复筛试验中, 将初筛获得的转化子发酵液细分, 各主分经琼脂稀释制成平板, 进行稗草生长量的平板试验, 每处理重复 3 次, 每个试验重复至少 2 次。所得数据用 Data processing system 分析^[7]。

1.2.4.1 分生孢子对稗草生长的影响。发酵液离心, 孢子用无菌 ddH₂O 重悬, 清洗 3 次^[8]。将调到相同浓度的孢子悬液

基金项目 上海市科委国际合作项目(053107074); 上海市科委崇明生态岛科技支撑重大专项(05DZ19104)。

作者简介 李薇(1980-), 女, 辽宁沈阳人, 硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。* 通讯作者, 教授, E-mail: jiechen59@sjtu.edu.cn。

收稿日期 2007-06-10

冰箱储存备用(4)。

1.2.4.2 超声波PBS法破碎孢子对稗草生长的影响。发酵液离心,孢子用无菌ddH₂O重悬,清洗3次,由PBS缓冲液调到孢子10⁸个/ml。用超声波破碎仪将分生孢子破碎(400S × 60%, 0.4 cycle)。破碎时间分别为10、20、30、40、50、60 min,考察破碎效果^[9-10]。

1.2.4.3 发酵液(去除孢子)对稗草生长的影响。发酵液离心获得上清液,用0.45 μm的微孔滤膜过滤,取膜下液体冰箱储存备用(4)。

2 结果与分析

2.1 REM转化 在经过REM转化后,共得到35个转化子可以在含有300 μg/ml潮霉素水琼脂培养基上生长,但是在第2次用含有250 μg/ml潮霉素PDA进行筛选时,有18个转化子仍可以正常生长,因此,可初步认为该18个转化子即为T23的REM转化突变体。经过继代培养后证明18个转化子均是稳定的REM转化子,其转化率达到51.43%。

图1即是T23部分转化子在PDA上稳定培养所表现的性状,可以观察到它们菌丝生长能力和产孢能力与出发菌T23相比,不完全一致。如TbA4的菌丝生长能力明显高于出发菌株,而TbA4的产孢能力却低于T23。说明REM技术的外源插入对产生的转化子的突变是随机的。

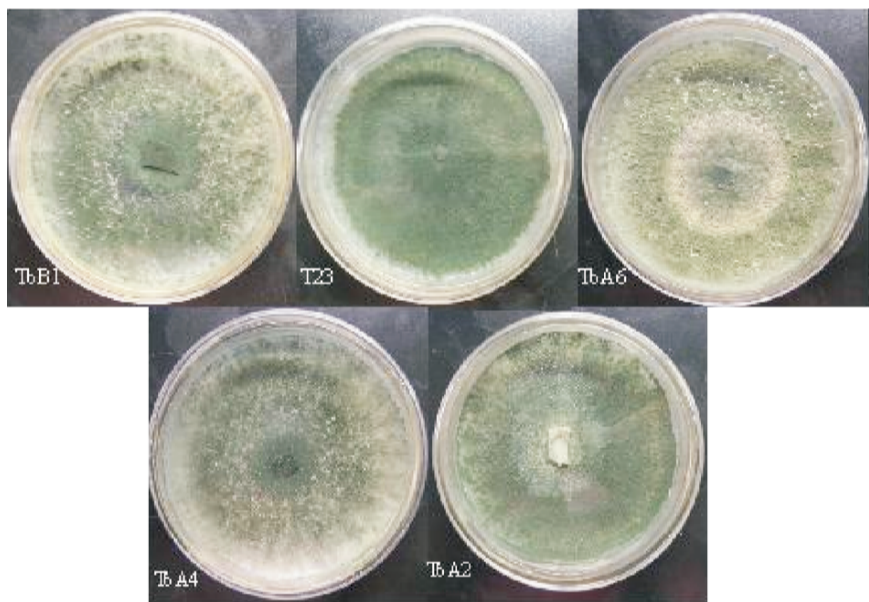
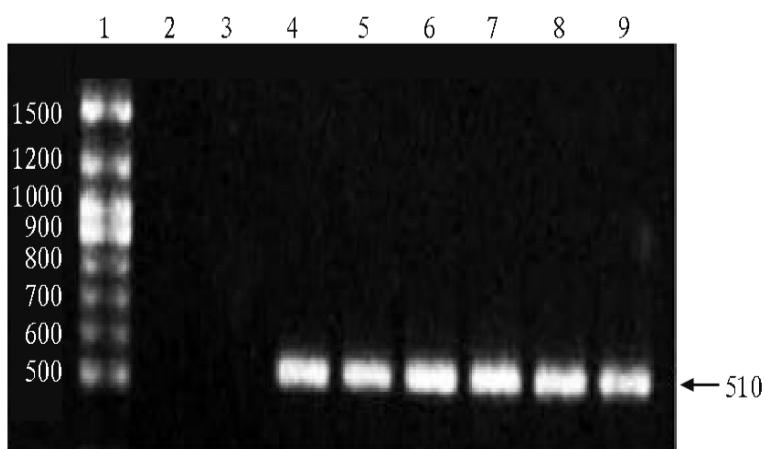


图1 T23及部分转化子的PDA培养

2.2 转化子PCR检测 对由REM技术得到的18个转化子进行了PCR检测,分别利用水解潮霉素和氨基青霉素基因为引物进行特异性扩增,结果转化子扩增出目的条带。由图2可知,以水解潮霉素基因的引物1和2进行PCR扩增时,与



注:1. DNA标准分子量;2. 水;3. T23;4. pV2;5. TbA2;6. TbA4;

7. TbA6;8. TbC3;9. TbE。下表同。

图2 利用hph引物对质粒pV2插入T23的PCR检测

阳性对照(pV2)相同,所有转化子的特异条带都出现在510

bp,而出发菌株T23和H₂O均没有出现任何条带。图3表明:以抗氨苄基因的引物3和4进行PCR时,特异扩增带出现在840 bp,阳性对照同样也具有目的条带,而阴性对照T23和H₂O无任何条带。由此,可以初步认为质粒pV2已经成功地插入到野生型菌株T23。

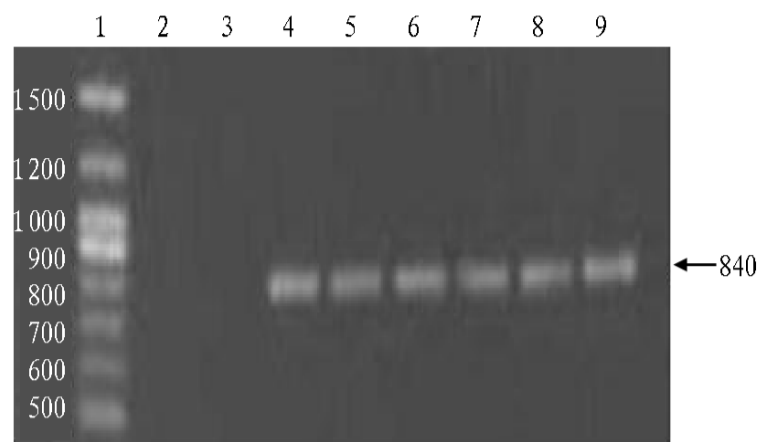
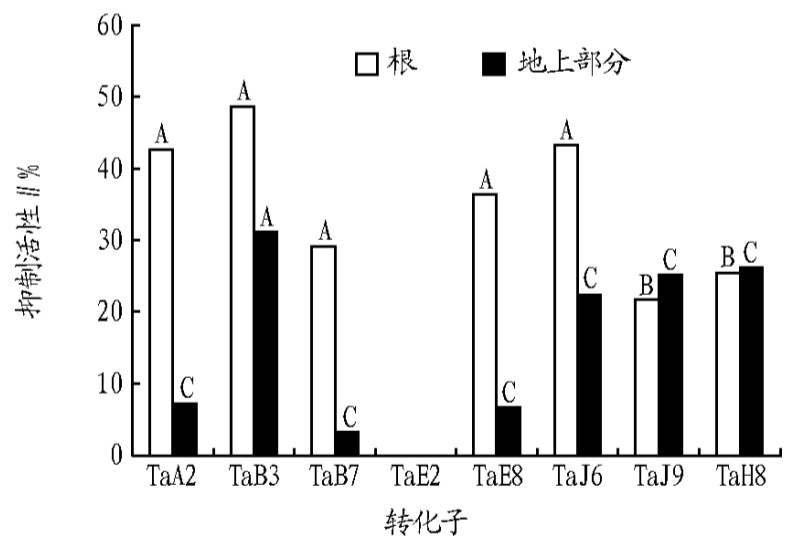


图3 利用amp引物对质粒pV2插入T23的PCR检测

2.3 REM转化子发酵液抑制稗草活性测定(初筛试验) 对T23的转化子库中109个发酵液稀释制平板进行抑草活性测定,获得转化子TaA2、TbB3、TbB7、TbE2、TbE8、TbH8、TbJ6和TbJ9。

2.4 复筛试验

2.4.1 转化子分生孢子对稗草生长的影响。生物学检测结果显示:与T23相比,除了TbE2的其余7个转化子的分生孢子对稗草的根部生长有明显的抑制作用;对稗草的地上部抑制程度不同,其中TbB7的抑制作用不明显,TbA2、TbB3、TbB7、TbE2、TbJ6和TbJ9对稗草地上部的影响远小于对稗草根部生长的抑制作用;TbB3分生孢子对稗草根部和地上部分抑制效果最好,分别达到48.64%和31.17%,并且在0.01水平差异显著(图4)。



注:A表示在0.01水平差异显著;B表示在0.05水平差异显著;

C表示差异不显著。下同。

图4 木霉T23部分转化子分生孢子对稗草生长的抑制活性测定

2.4.2 超声波PBS法破碎转化子孢子对稗草生长的影响。结果显示:在孢子浓度为10⁸个/ml,输出功率为60%时,作用时间为30 min开始没有活性孢子存活(表1)。试验选择40 min为最后的超声波处理时间。

表1 超声波破碎分生孢子作用时间对孢子存活的影响

时间 min	真菌生长量	时间 min	真菌生长量
0	+++	40	-
10	++	50	-
20	+	60	-
30	-		

注:“+”越多,表示生长菌落越多;“-”表示没有生长菌落。

分生孢子破碎后进行抑草活性生物学检测,结果表明:与T23相比,除了TaE2的其余7个转化子的分生孢子对稗草的根部生长有抑制作用,其中TaJ6效果最明显,抑制率达33.13%;TaB3次之,抑制率为29.93%;TaJ9效果没有其他转化子明显,抑制率仅为4.73%;分生孢子破碎后对稗草的地上部分没有较好的抑制作用(图5)。

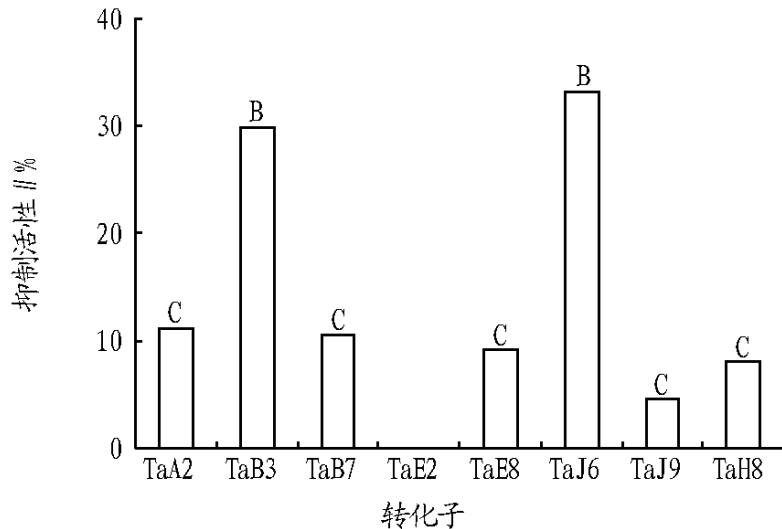


图5 木霉T23部分转化子分生孢子破碎液对稗草生长的抑制活性测定

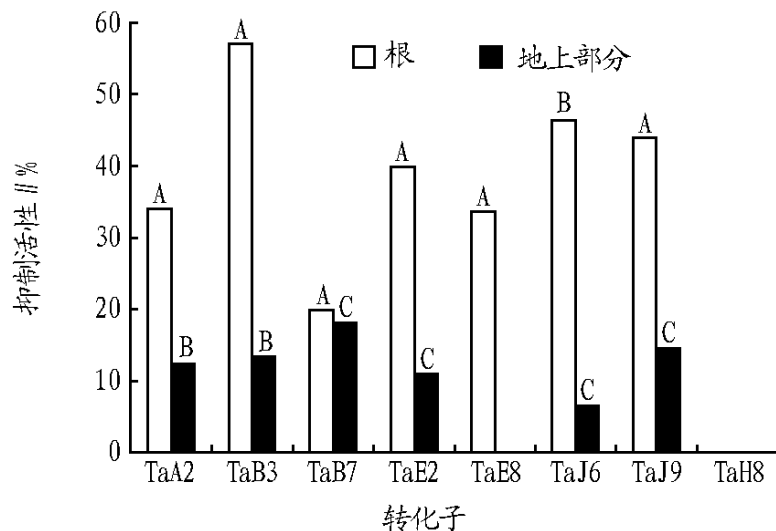


图6 木霉T23部分转化子发酵液(除孢子)对稗草生长的抑制活性测定

2.4.3 发酵液(去除孢子)对稗草生长的影响。结果显示(图6):与T23相比,除了TaH8的其余7个转化子的发酵液

对稗草的根部生长有抑制作用,其中TaB3效果最好,抑制率达到57.07%,在0.01水平差异显著;TaE8对稗草地上部分没有抑制作用。

3 结论与讨论

木霉菌是一类应用广泛且具有防病增产功能的生物防治真菌。在实际应用中人们发现,多数木霉菌具有促进作物生长的功能,由于有些木霉菌株系与宿主植物具有专化性互作的效应,即有些可表现为刺激生长作用,有些可表现为抑制作用。因此,如何合理利用具有特异性抑制功能菌株,筛选可产生抑草代谢物的菌株,对丰富未来生物除草剂先导化合物菌源库具有重要意义。笔者发现,REM方法所创造的转化子中可以较高效地筛选出具有抑草功能的突变体,为从突变株获得抑制杂草、低毒、环境友好的新化合物提供生物工程方法,同时也为今后木霉菌-宿主植物非亲和互作和新型农药的深度开发奠定基础。

参考文献

- [1] 涂玉琴. 生物农药的研究和应用进展[J]. 江西植保, 1998, 21(4): 32-35.
- [2] HARMANG E. New advances in science and use of *Fichoderma* spp[J]. Journal of Zhejiang University: Agric & Life Sci, 2004, 30(4): 388.
- [3] HOWELL C R. Production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases[J]. Biological Control, 1993, 3: 435-441.
- [4] 黄玉茜. 木霉菌工程菌株的构建及其与宿主植物互作的机理研究[D]. 沈阳农业大学, 2005.
- [5] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1998.
- [6] 李薇. 木霉菌REM转化子对水田稗草生长的影响[J]. 上海交通大学学报, 2006, 24(增刊): 90-92.
- [7] TANG Q Y, FENG M G. DPS Data processing system: Experimental design, statistical analysis, and data mining[M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [8] SUDISHA J. Transmission of seed-borne infection of muskmelon by *Dendryella bryoniae* and effect of seed treatments on disease incidence and fruit yield[J]. Biological Control, 2006, 37: 196-205.
- [9] AURELIO LOPEZ MALO, ENRIQUE PALOU. Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and antimicrobials[J]. Journal of Food Engineering, 2005, 67: 87-93.
- [10] GULABVALA. Effectiveness of electrochemically activated water as a sanitizer in an infected tooth model[J]. International Endodontic Journal, 2004, 37: 624-631.