

以 G418 为筛选标记的极细链格孢菌 (*Alternaria tenuissima*) 原生质体转化体系的建立

万英^{1,2}, 张大军², 黄云¹, 蒋伶俐²

(1. 四川农业大学农学院植物病理系, 四川雅安 625014; 2. 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 100081)

摘要 [目的] 建立极细链格孢菌 (*Alternaria tenuissima*) 的原生质体遗传转化体系。[方法] 采用酶解法制备极细链格孢菌的原生质体, 并通过 PEG/CaCl₂ 介导的化学方法将含有 G418 抗性标记的 DNA 转入极细链格孢菌原生质体。[结果] 转化子生长表型及其基因组 DNA 的 PCR 检测表明抗性基因已成功整合到极细链格孢菌基因组中。该方法的转化率达 3~4 个转化子/μg 转化 DNA。所获得的转化子在无选择压力下连续培养 3 代, G418 抗性仍能稳定遗传。[结论] 成功建立了极细链格孢菌的遗传转化系统, 为极细链格孢菌的基因功能研究奠定了基础。

关键词 极细链格孢菌; G418 抗性; 原生质体; 转化

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)29-12602-03

Establishment of Protoplast Transformation System in *Alternaria tenuissima* Using G418 Selection Marker

WAN Ying et al (Department of Plant Protection, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

Abstract [Objective] The study aimed to establish the protoplast transformation system in *Alternaria tenuissima*. [Method] The protoplast of *Alternaria tenuissima* was firstly prepared by enzymolysis method; then the yielded protoplast was transformed by G418 resistant DNA plasmid using PEG/CaCl₂ method. [Result] The growth phenotype and PCR detection showed that resistance gene had integrated into *Alternaria tenuissima* genome. The transformation efficiency of this method reached per μg DNA 3-4 transformants. After subculture thrice under nonselective condition, G418 resistance could still inherit stably. [Conclusion] The transformation system of *Alternaria tenuissima* was successfully established, which laid basis for studying of the gene function of *Alternaria tenuissima*.

Key words *Alternaria tenuissima*; G418 resistance; Protoplast; Transformation system

极细链格孢菌 (*Alternaria tenuissima*) 是一种植物病原真菌, 对环境适应性强, 宿主广泛, 不仅能侵染柚、脐橙、柑橘、葡萄、柠檬、杏、草莓等水果, 还可在花生、向日葵、小麦、棉花、辣椒、豇豆、大豆及绿穗苋等多种植物上寄生^[1-2], 引起多种植物黑斑病, 给农业生产造成巨大损失。然而, 极细链格孢菌又可作为有用的生物资源, 应用于生物防治、环境废弃物处理等方面^[3-4]。

为研究极细链格孢菌基因的功能, 更好地开发利用其有益特性, 就需要往极细链格孢中引入外源基因。而建立高效的遗传转化系统是引入外源基因的前提。早在 1973 年, Rochefeller 大学 E. L. Tatum 实验室利用肌醇缺陷型 (*inl⁻*) 粗糙脉孢菌转化丝状真菌, 然而, 在大多数丝状真菌中难以获得适宜的营养缺陷型菌株。随着遗传转化技术的发展, 不依赖分离营养缺陷型即可实现转化的方法应运而生。到目前为止已有潮霉素 B、G418 等多种显性抗性基因作为选择标记成功应用于真菌的分子遗传学研究中^[5]。G418 的显性选择特性已在酵母等真菌研究中得到广泛的应用^[6-8]。该研究以 G418 为抗性筛选标记, 首次成功构建了极细链格孢菌的遗传转化系统, 为极细链格孢菌的基因功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株 极细链格孢菌 JH505 菌株^[9]保存于 PDA 培养基上。大肠杆菌菌株为 DH5α。

1.2 培养基和试剂 PDA 固体培养基 (马铃薯 200 g, 蔗糖 20 g, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1 000 ml)、YEPD 液体培养基 (酵母

提取物 5 g, Bacto 蛋白胨 20 g, D-葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 ml)、TB3 液体培养基 (酵母提取物 3 g, 酸水解酪素 3 g, 蔗糖 20%, 蒸馏水 1 000 ml)、底层培养基 (含 0.7% 低熔点琼脂糖的 TB3 培养基, 含 100 mg/ml 氨苄青霉素和 100 mg/ml G418)、上层培养基 (含 0.7% 低熔点琼脂糖的 TB3 培养基和 100 mg/ml G418)。

STC Buffer: 20 g 蔗糖, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、50 mmol/L CaCl₂ 蒸馏水定容至 1 000 ml, 高压蒸汽灭菌。原生质体 Buffer: 0.5% 崩溃酶 (Sigma)、1% 纤维素酶 (日本 Yakult. Co.)、1% 裂解酶 (Fluka)、1% 蜗牛酶 (纽朴生物技术有限公司), 用 0.7 mol/L NaCl 配制。PTC 溶液: 40% PEG6000/1 × STC, 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

1.3 质粒 pGL-b-a 的构建 根据极细链格孢菌 LEU2 基因 cDNA 序列^[9]设计引物 AtLEU2-F3 (5-ACATGCATGCCAATTCATCATGACTGCTC-3), AtLEU2-R1 (5-AACTGCAGAATTGTCAGAAGGCGTTGC-3); 引物 AtLEU2-F2 (5-CGGGATCCTGAGCAAGGAATCCTAAG-3), AtLEU2-R2 (5-CGAAATTCATAGATTCCGTTACAGC-3), 分别从极细链格孢菌基因组 DNA 中扩增 LEU2-a 及 LEU2-b 片段。将 PCR 产物 LEU2-a 片段和 LEU2-b 片段分别克隆到 pMD18-T 载体上, 得到克隆 pMD-LEU2-a 和 pMD-LEU2-b。用 Eco RI/Bam HI 对质粒 pMD-LEU2-b 进行双酶切, 电泳后胶回收 b 段, 克隆到 Eco RI/Bam HI 双酶切过的 pUC19-G418 质粒载体, 得到质粒 pGL-b。Pst I 酶切 pMD-LEU2-a 质粒, 胶回收 a 片段, 克隆到 Pst I 酶切的 pGL-b 质粒中。用引物 M13R/AtLEU2-F3 进行 PCR 验证筛选, 所获 a、b 片段方向一致的阳性克隆, 即为 pGL-b-a 质粒。

1.4 G418 敏感性测定 将极细链格孢菌菌丝块接种于 PDA 平板上, G418 浓度梯度分别为 50、100、200 和 400

基金项目 国家重点基础研究项目 (NO. 2006CB101907)。

作者简介 万英 (1980 -), 女, 四川犍为人, 硕士, 从事经济植物病害及其生物防治。*通讯作者。

收稿日期 2008-07-15

mg/L, 以不含 G418 的 PDA 为对照, 28 °C 培养 4 d, 3 次重复。

1.5 菌丝体的收集 收集极细链格孢菌的分生孢子, 无菌水配制孢子浓度为 1×10^8 个/ml 溶液; 将 3×10^8 个孢子接种于 YEPD 培养液中, 28 °C 摇床 200 r/min 培养 24 h, 收集菌丝体。

1.6 原生质体的制备 参照伏建国等^[10]的方法, 并进行适当修改。将收集到的新鲜菌丝体用无菌水洗涤 2 次, 0.7 mol/L NaCl 稳渗剂洗涤 3 次; 用 10 ml 原生质体缓冲液将新鲜菌丝充分悬浮, 30 °C 摇床 80 r/min 消化 4 h; 将 2 层无菌擦镜纸置于三角瓶上的漏斗上, 过滤后 4 000 r/min 常温离心 5 min, 去上清, STC 缓冲液洗涤 3 次, 调节终浓度为 $(2 \sim 5) \times 10^7$ 个/ml 备用。

1.7 原生质体的转化 取以上制备的原生质体 200 μ l (约 1×10^7 个/ml), 加入 10 μ g pGL-b-a 质粒 DNA, 用去头吸头缓慢上下吹打混匀, 室温静置 20 min; 加 1.25 ml 40% PTC, 颠倒混匀, 室温静置 20 min, 加入 5 ml TB3 和氨苄青霉素 (终浓度 100 μ g/ml), 28 °C 摇床 200 r/min 培养过夜; 室温 4 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加 200 μ l STC 重悬沉淀, 加入 10 ml 50 °C 底层琼脂糖培养基, 混匀, 铺于平板之上, 28 °C 培养过夜。第 2 天向每个培养物铺 10 ml 50 °C 上层琼脂糖培养基, 28 °C 继续培养 3 ~ 4 d 获得转化子。

1.8 G418 抗性筛选及稳定性测试 将所获得的转化子转接到含有 100 mg/L G418 的新鲜 PDA 培养基上, 28 °C 培养箱培养 2 ~ 3 d。提取转化子基因组 DNA, 用 PCR 扩增验证转化子基因型。

为了测定转化子中遗传标记是否稳定, 将转化子接种到不含 G418 的 PDA 固定培养基上, 28 °C 恒温培养 3 d, 挑取菌落边缘菌丝接种到新的 PDA 平板上培养, 连续转接 3 代, 之后接种到含 G418 100 mg/L 的 PDA 平板上培养, 观察转化子的生长情况。

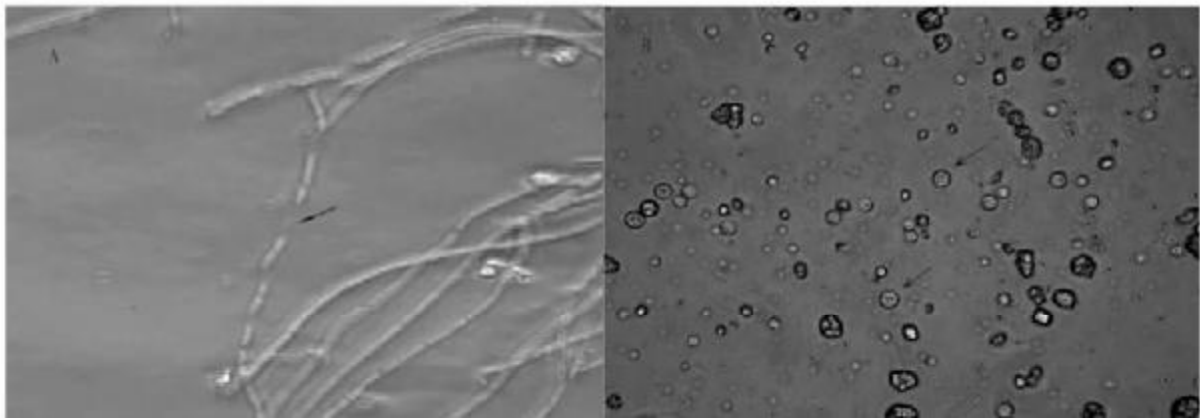
1.9 PCR 检测 CTAB 法提取转化子基因组 DNA, 根据 pGL-b-a 质粒上 G418 抗性基因 5' 和 3' 端序列设计一对特异引物, 上游引物 (G418F): 5'-AAC AAG ATG GAT TGC ACG C-3', 下游引物 (G418R): 5'-TGA TGC TCT TCG TCC AGA TC-3', PCR 扩增验证转化子 G418 抗性基因是否整合到基因组上, 以野生型菌株及阳性质粒为对照。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 扩增 35 循环; 72 °C 10 min。

2 结果与分析

2.1 G418 敏感性 极细链格孢菌在含有不同 G418 浓度的 PDA 培养基上生长试验结果表明, 当 G418 的浓度达到 50 mg/L 能显著抑制极细链格孢菌的生长, 而 100 mg/L G418 完全抑制极细链格孢菌的生长, 因此选择含 100 mg/L G418 筛选转化子。

2.2 原生质体的制备 在原生质体 Buffer 中, 30 °C 1 h 处理后取出少量消化液镜检发现菌丝开始断裂, 且可见单个细胞的存在 (图 1A)。消化 4 h 后可见大量的原生质体形成 (图 1B), 浓度达到 3.2×10^7 个/ml。

2.3 转化与转化子的鉴定 在含 100 mg/L G418 的选择性



注: A, 菌丝用原生质体缓冲液在 30 °C 摇床 (80 r/min) 处理 1 h 后原生质体的形成情况; B, 菌丝用原生质体缓冲液在 30 °C 摇床 (80 r/min) 处理 4 h 原生质体的形成情况。

Note: A, The formation of protoplast from mycelium digested by protoplast buffer at 30 °C shaking for 1 h; B, The formation of protoplast from mycelium digested by protoplast buffer at 30 °C shaking for 4 h.

图 1 不同消化时间对原生质体形成的影响

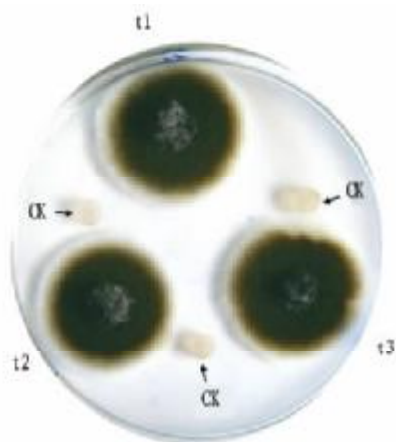
Fig. 1 Effects of different digestion time on the formation of protoplast

培养基上筛选极细链格孢菌转化子。转化 3 d 后, 挑取转化子菌落转接至含 100 mg/L G418 的 PDA 平板上, 结果发现大部分转化子 (流产子) 不能生长。结合多次转化结果, 该试验方案转化子的平均转化率约 3 ~ 4 个/ μ g DNA。

选取 3 个转化子 t1、t2 和 t3, 在含 100 mg/L G418 的 PDA 平板上培养 3 d。结果表明 t1、t2 和 t3 都能生长, 而野生型对照不能生长 (图 2), 这一生长表型表明 3 个转化子中含有表达的 G418 抗性基因。将 t1、t2 和 t3 在不含 G418 的

PDA 上继代培养 3 次, 然后转接至含 100 mg/L G418 的 PDA 平板上, 它们仍能稳定生长 (结果未列出), 说明这 3 个转化子的抗性在遗传上是稳定的。

2.4 转化子基因型的 PCR 验证 提取转化子 t1、t2 和 t3 的基因组 DNA 作为模板, 用 PCR 方法检测其是否含有插入的标记基因。以质粒 pGL-b-a DNA 和野生型 JH505 菌株基因组 DNA 分别做正负对照, 用 G418 基因内的上下游引物 G418F/G418R 进行 PCR 扩增。PCR 结果表明从转化子基因



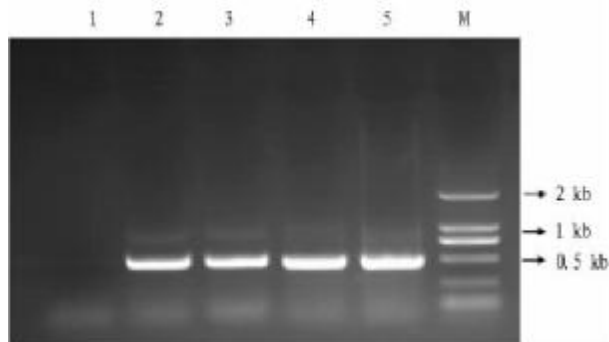
注:CK,野生型菌株;t1,t2和t3,3个不同的转化子。

Note: CK, wild type strain; t1, t2 and t3, three different transformants.

图2 转化子在 G418 平板上的生长情况

Fig. 2 The growth of transformants on G418 plate

组和质粒 DNA 中均能扩增出预期大小约 0.5 kb 的 G418 基因片段,而从野生型 JH505 基因组中则不能扩增出该特异片段,表明 G418 抗性基因已经成功转入转化子染色体中(图 3)。



注:M,DNA marker;1, pGL-b-a 质粒;2,转化子 t1;3,转化子 t2;4,转化子 t3;5,野生型菌株 JH505。

Note: M, DNA marker; 1, pGL-b-a plasmid; 2, transformant t1; 3, transformant t2; 4, transformant t3; 5, wild type strain HJ505.

图3 转化子的检测

Fig. 3 PCR amplification of transformants

3 讨论与结论

该研究利用 PEG/CaCl₂ 化学介导的转化方法,将含有 G418 抗性标记的 DNA 片段成功转入极细链格孢菌原生质体中。对转化子基因组 DNA 的 PCR 检测结果以及抗性生长表型表明,G418 抗性基因已成功整合到极细链格孢菌基因组 DNA 中并且得到功能性表达。原生质体的量是影响转化

结果的关键因素之一。该研究中,如果一次转化体系中所用的原生质体低于 10⁶ 个,就几乎得不到转化子。Tanaka et al 也认为成功转化所需的原生质量为 10⁷ 左右^[11]。因此,大量原生质体的获得成为成功转化的前提条件。由于不同真菌的细胞壁存在差异,因而制备原生质体所用的酶以及适合的酶解条件和方法也不同。该研究首次报道了极细链格孢菌原生质体的成功制备,采用崩溃酶、蜗牛酶、纤维素酶和裂解酶的混合体系能够有效酶解极细链格孢菌的细胞壁,酶解 4 h 可以获得大量的原生质体。

转化子在非选择性平板上经过 3 代继代培养后仍能够在含 100 mg/L G418 的选择培养基上生长,表明 G418 抗性基因在极细链格孢菌中能够稳定遗传。该研究结果表明,G418 抗性基因可作为遗传标记对极细链格孢菌进行转化,为其基因功能的研究提供一条新途径。

参考文献

- [1] BLODGETT J T, SWART W J. Infection, colonization, and disease of *amaranthus hybridus* leaves by the *Alternaria tenuissima* Group[J]. Plant Disease, 2002, 86(11): 1199 - 1205.
- [2] MOHAMED ZAHIDUR RAHMAN, YUICHI HONDA, SAYED ZAHIRUL ISLAM, et al. Leaf spot disease of broad bean (*Vicia faba* L.) caused by *Alternaria tenuissima*-A new disease in Japan[J]. J Gen Plant Pathol, 2002, 68: 31 - 37.
- [3] LUGAUSKAS A, PROSYCHEVAS I, LEVINSKAITE L, et al. Physical and chemical aspects of long-term biodeterioration of some polymers and composites[J]. Environmental Toxicology, 2004, 19(4): 318 - 328.
- [4] FENG F, QIU D, JIANG L. Isolation of cDNA sequences encoding the MAP kinase HOG1 and the MAP kinase kinase PBS2 genes of the fungus *Alternaria tenuissima* through a genetic approach[J]. J Microbiol Methods, 2007, 69(1): 188 - 196.
- [5] 陈振明, 郭泽建, 林福呈. 以潮霉素抗性为选择标记的毛壳霉原生质体转化[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2001, 27(1): 19 - 22.
- [6] 蓝秀万, 陈敏玫, 桂磊. G418 抗性筛选标记在板栗疫病菌中的应用[J]. 广西农业生物科学, 2007, 26(S1): 7 - 11.
- [7] ESTRUCH F, PRIETO J A. Construction of a Trp-commercial baker's yeast strain by using food-safe-grade dominant drug resistance cassettes[J]. FEMS Yeast Research, 2003, 14: 329 - 338.
- [8] LIU Y Y, LI Y, LIU L Y. Design of vectors for efficient integration and transformation in *hansenula Polymorpha*[J]. Biotechnology Letters, 2005, 27: 1529 - 1534.
- [9] WAN Y, WANG X L, QIU D W, et al. Identification and characterization of cDNA sequences encoding the HIS3 and LEU2 genes of the fungus *Alternaria tenuissima*[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2008, 35(4): 521 - 526.
- [10] 伏建国, 强胜, 朱云枝. 链格孢菌原生质体的制备与限制性内切酶介导整合(REMI)转化的致病性诱变[J]. 菌物学报, 2005, 24(3): 407 - 413.
- [11] TANAKA A, SHIOTANI H, YAMAMOTO M, et al. Insertional mutagenesis and cloning of the genes required for biosynthesis of the host-specific AK-toxin in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1999, 12(8): 691 - 702.