

文章编号: 1674-7054(2022)03-0243-06



根癌农杆菌介导火龙果溃疡病菌遗传转化体系的构建及转化子筛选

王伟伟, 安馨媛, 陈俊菁

(海南大学 林学院/海南省热带特色花木资源生物学重点实验室, 海口 570228)

摘要: 为了探究火龙果溃疡病菌病原菌的致病机理, 笔者利用农杆菌介导的遗传转化技术, 分析了根癌农杆菌浓度、分生孢子萌发时间以及共培养温度等 3 个主要因素对遗传转化效率的影响, 建立火龙果溃疡病菌的遗传转化技术体系, 并对转化子进行筛选。结果表明, 当农杆菌浓度 $OD_{600}=0.5$ 、分生孢子萌发时间 24 h、共培养温度 25 °C 时遗传转化效率最高(833 个转化子/ 10^6 分生孢子); 随机挑选 200 个转化子进行筛选, 获得 3 株菌落形态与野生型菌株差异较大的转化子, 4 株产孢量减少的转化子, 5 株产孢量增加的转化子, 6 株致病力下降的转化子。

关键词: 火龙果溃疡病菌; 农杆菌介导; 遗传转化; 筛选

中图分类号: S 436.67; S 667.9 **文献标志码:** A

引用格式: 王伟伟, 安馨媛, 陈俊菁. 根癌农杆菌介导火龙果溃疡病菌遗传转化体系的构建及转化子筛选 [J]. 热带生物学报, 2022, 13(3): 243-248. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2022.03.006

火龙果又名红龙果, 属仙人掌科 (Cactaceae) 量天尺属 (*Hylocereus*), 是极具发展前景的热带和亚热带水果^[1]。火龙果因具有较高的经济价值和营养价值, 集蔬菜、水果、花卉和保健于一体, 被誉为“21 世纪保健食品和果品珍品”, 受到人们的青睐, 具有广阔的国际、国内市场^[2]。火龙果 20 世纪 80 年代才引入我国台湾, 虽然在我国栽培历史较短, 但发展迅速, 目前主要在台湾、海南、广西、广东、福建、贵州等省区种植。溃疡病是近年来火龙果种植园发生的严重真菌病害之一, 发病率高达 60%^[3-7]。溃疡病造成火龙果枝条腐烂, 果实变黑, 失去食用价值, 有些果园甚至颗粒无收。该病害在夏秋季高温高湿的气候条件下发病尤为严重, 尤其台风过后更容易大面积暴发, 这也是该病在海南地区盛行的主要原因之一。该病害由新暗色柱节孢 (*Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) Crous &

Slippers) 侵染引起的^[4-11], 开展病原菌的致病机理研究可以为病害防治所需新药以及抗性种苗的研发提供相关的理论依据, 从而达到对病害长期、有效的防控。病原菌基因功能缺失突变体的构建是研究病原菌致病机理的有效手段, 这一方法的关键技术是建立遗传转化体系。农杆菌介导的遗传转化 (*Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation) 可快速构建真菌 T-DNA (transfer DNA) 随机插入突变体, 因其操作简单, 可转化完整的细胞, 比如分生孢子、菌丝、子实体等, 免去了制备原生质体的繁琐, 广泛应用于多种真菌^[12]。目前已有 100 多种真菌使用该方法进行成功转化^[13], 比如玉米大斑病菌^[14]、稻瘟病菌^[15]、尖镰孢菌^[16]、玉米灰斑病菌^[17] 等。本研究拟建立根癌农杆菌介导的火龙果溃疡病菌的遗传转化体系, 为火龙果溃疡病菌致病机理的研究奠定技术基础。

收稿日期: 2021-06-24

修回日期: 2021-11-15

基金项目: 2019 年海南省基础与应用基础研究计划 (自然科学领域) 高层次人才项目 (2019RC135); 海南省高等学校科学研究项目 (Hnky2018-15)

第一作者: 王伟伟 (1985-), 女, 博士, 讲师. 研究方向: 植物病理学. E-mail: wvivi2016@hainanu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料 火龙果溃疡病菌野生型菌株由本实验室分离、鉴定和保存。农杆菌菌株 EHA105 由海南大学热带农林学院陈银华教授馈赠。载体 pXEH8279 (Kana^R, HygB^R) 由吉林大学植物科学学院潘洪玉教授馈赠。实验用培养基 IM、IAM^[12]。

1.2 火龙果溃疡病菌对潮霉素 (HygB) 最低耐受浓度的确定 将火龙果溃疡病菌野生型菌株接种在 PDA 培养基上活化,待长至菌落直径约 5 cm 时,用 5 mm 打孔器在菌落边缘打孔取菌饼,并将菌饼转接在加有不同浓度 HygB(0、25、50、100、150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 PDA 培养基上,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光培养。每处理 3 重复,培养 7 d 后,观察菌落生长情况,确定最佳的 HygB 筛选浓度。

1.3 遗传转化

1.3.1 农杆菌的准备 将携带有质粒 pXEH8279 的农杆菌菌株 EHA105 在卢里亚-贝尔塔尼平板培养基 (LB)[利福平 (rif) 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,卡那霉素 (Kana) 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]上划线,置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养至长出单菌落。挑取单菌落转移至新的 LB 平板培养基 (rif 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Kana 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)上划线,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后,用灭菌的药匙刮取农杆菌,使其分散在 IM 培养基内,28 $^{\circ}\text{C}$,200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,培养 4~6 h,使其 OD_{600} 达到 0.5,置于 50 mL 无菌管中备用。

1.3.2 火龙果溃疡病菌分生孢子的准备 将活化的火龙果溃疡病菌野生型菌株接种在 PDA 培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 后,吸取 0.01% 吐温 20 于培养基上,用无菌棉棒将分生孢子轻轻洗下,然后用 4 层灭菌纱布过滤,制成分生孢子悬浮液。取适量分生孢子悬浮液于 PD 培养基中,调整分生孢子浓度至 5×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,避光放置在摇床上,转速为 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,室温下萌发 24 h。

1.3.3 共培养 诱导培养的农杆菌与萌发的分生孢子悬浮液等体积混合后,于 25 $^{\circ}\text{C}$,80 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,摇培 20~30 min。吸取 100 μL 混合液,涂布在共培养培养基 (IAM, Induced Agar Medium)上,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养。共培养 48 h 后,在 IAM 上倒筛选培养基,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养。筛选培养基即加有潮霉素 (HygB, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、头孢霉素 (Cef, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、氨苄青霉素 (Amp, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的马铃薯葡萄糖

琼脂(PDA)培养基。培养 5~6 d 后即可见有单菌落长出。

1.4 不同因素对转化效率的影响 根据以上遗传转化方法,依次验证以下因子对火龙果溃疡病菌遗传转化效率的影响,包括农杆菌浓度 OD_{600} (0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8)、分生孢子萌发时间(0、6、12、24、36、48 h)以及共培养温度(20、25、28、30、35 $^{\circ}\text{C}$),采用单因素试验,每个处理设置 3 个重复。

1.5 转化子的聚合酶链式反应 (PCR) 鉴定 随机挑选 8 株转化子以及野生型菌株接种在 PDA 培养基上,置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。4 d 后,用无菌枪头分别刮取培养基中的菌丝,转移至 1.5 mL 离心管中。分别向装有菌丝的离心管加入液氮,并用无菌塑料研磨棒迅速将菌丝研磨成粉状,利用 CTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵)法提取转化子及野生型菌株基因组 DNA。以 HygB 抗性基因片段为模板设计引物 hygF (5'-gaagaatctcgtgctttcag-3') 和 hygR (5'-gtacttctacagccatcg-3'),通过 PCR 方法验证 T-DNA 片段是否插入,目标片段长度 880 bp。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

1.6 转化子筛选

1.6.1 转化子菌落形态观察及产孢能力比较 将随机选取的 200 株转化子以及野生型菌株接种在 PDA 培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 d 后,用 5 mm 打孔器分别在菌落边缘取菌饼,并将菌饼转移至新的 PDA 培养基上,置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 7 d,观察菌落形态特征并拍照后,收集分生孢子,计算每皿产生的分生孢子数量。每个处理设置 3 个重复。

1.6.2 转化子致病力 采用田间接种方法,筛选致病力降低的转化子。具体操作如下:将转化子及野生型菌株分别接种在 PDA 培养基上,置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 4 d 后,用 5 mm 打孔器分别取菌落边缘菌饼;在海南大学儋州校区农科基地火龙果种植园选取健康的火龙果植株,用无菌刀片在茎上划出 5 mm 左右伤口,将菌饼转移至伤口处,并用保鲜膜包裹以保持湿度 [(28 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$, RH80%]。3 d 后观察发病情况并拍照。

2 结果与分析

2.1 火龙果溃疡病菌对 HygB 的最低耐受浓度

当 HygB 浓度为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时该菌完全不能生长(图 1), 故选取该浓度为火龙果溃疡病菌对 HygB 的最低耐受浓度, 用于后续实验中转化子的筛选。

2.2 火龙果溃疡病菌遗传转化体系的建立 当农杆菌浓度 OD_{600} 为 0.5 时遗传转化效率最高, 与其他处理差异显著(图 2-A); 当分生孢子萌发时间

为 24 h 时遗传转化效率最高, 与萌发时间为 36 h 时差异不显著, 而与其他处理差异显著(图 2-B), 但分生孢子萌发 36 h 实验周期较长, 且菌丝萌发造成实验操作难度加大, 故选取分生孢子萌发 24 h 作为最优; 当共培养温度为 25°C 时遗传转化效率最高, 且与其他处理差异显著(图 2-C)。通过以上研究, 农杆菌浓度 $OD_{600}=0.5$ 、分生孢子萌发时间 24 h、共培养温度 25°C 时遗传转化效率最高, 达到 833 个转化子/ 10^6 个分生孢子。

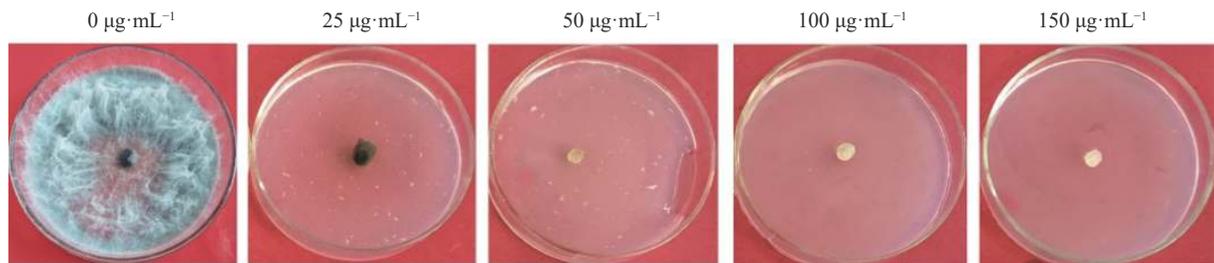


图 1 火龙果溃疡病菌对 HygB 的耐受性

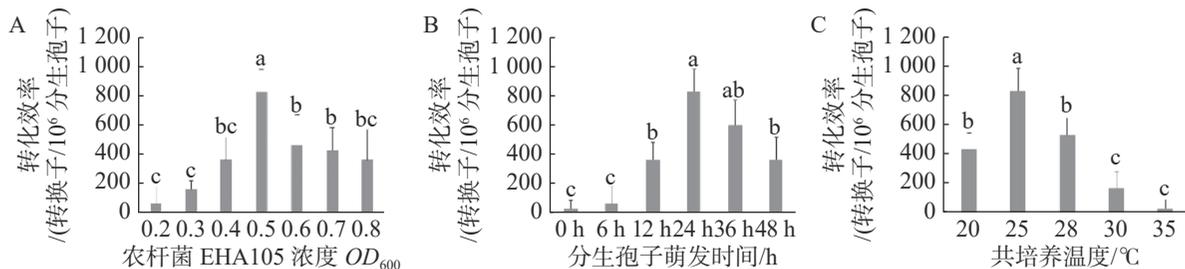


图 2 不同影响因素对遗传转化效率的影响

A. 农杆菌浓度; B. 分生孢子萌发时间; C. 共培养温度。a、b、c 代表不同处理间存在显著差异($P < 0.05$)。

2.3 转化子的 PCR 鉴定 提取转化子基因组 DNA, 通过 PCR 的方法扩增 T-DNA 片段上 HygB 抗性基因, 结果显示, 8 株转化子均能扩增出 HygB 抗性基因片段(880 bp), 初步可以确定 T-DNA 成功插入以上转化子基因组中(图 3)。

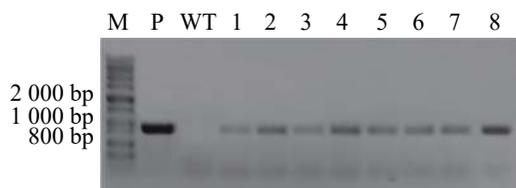


图 3 转化子 PCR 鉴定

M 为 Marker, P 为质粒, WT 为野生型, 1~8 分别代表不同转化子。

2.4 转化子筛选结果 野生型菌株气生菌丝旺盛, 直立, 后期颜色为灰黑色; 通过与野生型菌落

形态比较, 发现转化子 0-3-1 和 3-3-1 菌落形态差异较大, 气生菌丝浓密, 呈白色, 且转化子 3-3-1 不产生分生孢子; 转化子 24-3-2 气生菌丝稀疏, 颜色变淡(图 4-A)。转化子与野生型菌株产孢能力比较, 发现 4 株产孢量减少的菌株分别为 3-1-2、3-1-3、3-2-3 和 3-7-1, 其中, 3-1-3、3-2-3 与野生型差异显著($P < 0.05$), 3-1-2、3-7-1 与野生型差异极显著($P < 0.01$); 发现 5 株产孢量增加的菌株分别为 3-6-2、3-4-1、3-4-2、3-3-1 和 0-3-1, 其中, 0-3-1 与野生型差异显著($P < 0.05$), 其余 4 株与野生型差异极显著($P < 0.01$)(图 4-B)。通过接种实验, 发现 6 株致病力下降的菌株分别为 0-3、3-3-1、3-6-1、3-7-1、24-2-1、24-3-2(图 4-C)。以上转化子可用于后续实验。

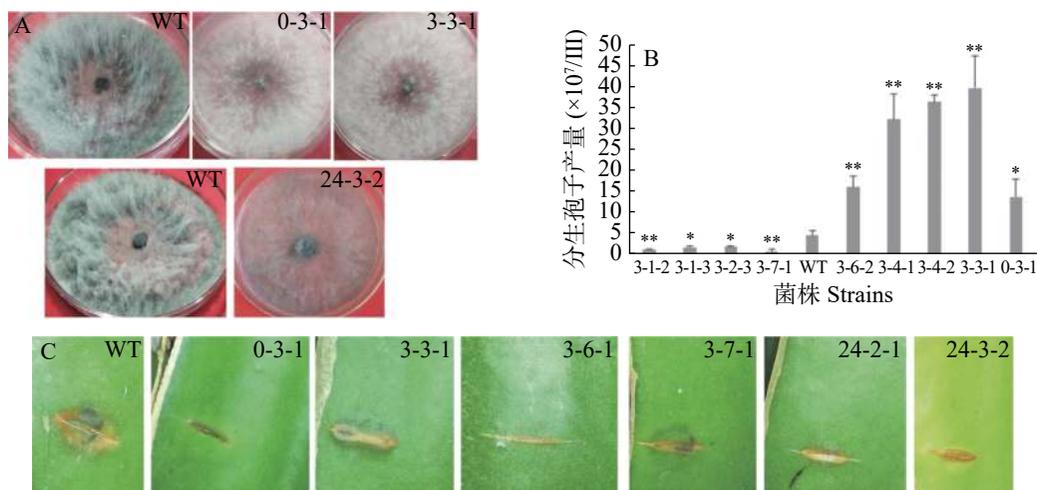


图4 转化子筛选结果

A. 菌落形态; B. 分生孢子产量; C. 转化子致病性验证。“*”代表与野生型比较差异显著($P<0.05$); “**”代表与野生型比较差异极显著($P<0.01$)。

3 讨论

据文献报道,影响根癌农杆菌介导丝状真菌遗传转化效率的因素有很多,比如根癌农杆菌菌株的选择、农杆菌浓度、真菌分生孢子浓度、共培养时间及共培养温度等^[12]。有研究表明,不同根癌农杆菌菌株对遗传转化效率的影响很大,已报道的用于丝状真菌遗传转化的农杆菌菌株有 AGL-1、EHA105、LBA1100、LBA4404 等,本研究选用 EHA105 菌株,实验证实可以成功转化。乙酰丁香酮(As)是该体系能否转化成功的决定性因素,根据文献报道,多数丝状真菌在 As 浓度为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时遗传转化效率最高^[18],本研究中 As 选用该浓度。转化受体的细胞浓度对遗传转化效率亦有影响,受体孢子浓度较高,转化效率也较高,本研究中发现分生孢子浓度过高会导致真菌过量生长而无法挑出转化子,设置分生孢子浓度为 5×10^5 可以获得较高的转化效率。据文献报道,共培养时间以 48 h 转化效率最高^[19],共培养时间过长反而会导致遗传转化效率降低,本研究选取共培养 48 h。

本实验主要研究了农杆菌浓度、分生孢子萌发时间及共培养温度对遗传转化效率的影响。理论上,农杆菌浓度越高,受体细胞被成功转化的概率越高,遗传转化效率越高,然而事实上,当农杆菌浓度过高时遗传转化效率反而降低,本研究中,当农杆菌 OD_{600} 为 0.5 时火龙果溃疡病菌的遗传转化效率最高,高于 0.5 则遗传转化效率降低。有

研究表明,未萌发的分生孢子作为受体不能够成功转化^[14,20]。本研究发现,当分生孢子萌发 24 h 时遗传转化效率最高,证实分生孢子受体的形态对火龙果溃疡病菌的遗传转化效率影响很大。研究者对 20~37 °C 内农杆菌的转化效率进行研究,发现 22~25 °C 是最适的共培养温度^[21]。本研究亦发现,25 °C 是火龙果溃疡病菌遗传转化的最适共培养温度。

通过农杆菌介导的遗传转化构建病原真菌的 T-DNA 随机插入突变体库,从中筛选致病力降低的突变体,并获得 T-DNA 侧翼序列,从而获得致病相关基因,这是目前研究病原真菌致病机制的主要方法之一。本研究通过建立的根癌农杆菌介导的遗传转化体系,获得 T-DNA 插入转化子,并从中筛选致病力降低的转化子,这些转化子可用于后续研究中,以获得致病相关的基因,通过致病相关基因功能研究,以阐明火龙果溃疡病菌的致病机理。

参考文献:

- [1] 黄凤珠, 陆贵锋, 黄黎芳, 等. 火龙果种质资源收集保存与初步评价[J]. 西南农业学报, 2016, 29(4): 206-210.
- [2] 吕春茂. 21 世纪水果珍品——火龙果[J]. 新农业, 2003(11): 26-27.
- [3] 袁诚林, 张伟锋, 袁红旭. 粤西地区火龙果病害调查初报及防治措施[J]. 中国南方果树, 2004, 33(2): 49-50.
- [4] 张荣, 刘爱媛, 白成艳, 等. 火龙果溃疡病的症状观察和病原菌鉴定[J]. 果树学报, 2013, 30(5): 854-856.
- [5] 彭超, 范鸿雁, 罗志文, 等. 海南火龙果产区真菌病害种类及为害情况调查[J]. 中国南方果树, 2015, 44(6):

- 121 – 124.
- [6] CHUANG M F, NI H F, YANG H R, et al. First report of stem canker disease of pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan [J]. *Plant Disease*, 2012, 96(6): 906 – 907.
- [7] MOHD M H, SALLEH B, ZAKARIA L. Identification and molecular characterizations of *Neoscytalidium dimidiatum*, causing stem canker of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia [J]. *Journal of Phytopathology*, 2013, 161(11/12): 841 – 849.
- [8] SOLSONA G S, LOPEZ P, PALMATEER A J. First report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing stem and fruit canker of *Hylocereus undatus* in Florida [J]. *Plant Disease*, 2016, 100(7): 1499.
- [9] 王会会, 符碧海, 戴俊, 等. 火龙果溃疡病菌的鉴定及室内药剂筛选 [J]. *中国南方果树*, 2016, 45(1): 8 – 12.
- [10] 魏雅丽, 张晓琳, 林庆光, 等. 一种火龙果病原真菌的分离鉴定与杀菌剂筛选 [J]. *海南大学学报: 自然科学版*, 2015, 33(1): 45 – 50.
- [11] 易润华, 甘罗军, 晏冬华, 等. 火龙果溃疡病原菌鉴定及生物学特性 [J]. *植物保护学报*, 2013, 40(2): 102 – 108.
- [12] 黄亚丽, 潘玮, 蒋细良, 等. 根癌农杆菌介导丝状真菌遗传转化的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2007(3): 111 – 114.
- [13] 陈东亮, 李纪元, 范正琪, 等. 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.
- [14] XUE C, WU D, CONDON B J, et al. Efficient gene knockout in the maize pathogen *Setosphaeria turcica* using *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT) [J]. *Phytopathology*, 2013, 103(6): 641 – 647.
- [15] RHO H S, KANG S, LEE Y H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea* [J]. *Molecular and Cells*, 2001, 12(3): 407 – 411.
- [16] MULLINS E D, CHEN X, ROMAINE P, et al. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer [J]. *Phytopathology*, 2001, 91(2): 173 – 180.
- [17] LU Y, XIAO S, WANG F, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as an efficient tool for insertional mutagenesis of *Cercospora zea-maydis* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, 133: 8 – 13.
- [18] 周芳芳, 李志芳, 冯自力, 等. 根癌农杆菌介导的真菌遗传转化研究进展 [J]. *棉花学报*, 2012, 24(5): 86 – 92.
- [19] 高兴喜, 杨谦, 郭兆奎, 等. 影响根癌农杆菌介导的木霉菌遗传转化因素分析 [J]. *微生物学通报*, 2005, 32(1): 74 – 78.
- [20] ABUODEH R O, ORBACH M J, MANDEL M A, et al. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181: 2106 – 2110.
- [21] MICHELSE C B, HOOYKAAS P J J, CEES A M J J VAN DEN HONDEL, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi [J]. *Current Genetics*, 2005, 48(1): 1 – 17.

Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for *Neoscytalidium dimidiatum* and Screening of Transformants

YU Weiwei, AN Xinyuan, CHEN Junjing

(Key Laboratory of Germplasm Resources of Tropical Special Ornamental Plants of Hainan Province, College of Forest, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract: Pitaya is a nutrient-rich fruit with high economic value and great development potential in tropical and subtropical region. Pitaya stem canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* is one of the most serious fungal diseases infecting pitaya, which has become a main factor restricting the development of pitaya. In order to control the disease effectively, it is necessary to study the pathogenic mechanism of the pathogen causing pitaya stem canker. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation was hence used to establish a genetic transformation system for *N. dimidiatum*. The effects of three main factors, concentration of *A. tumefaciens*, germination time of conidia, and co-culture temperature, on the transformation efficiency were analyzed, and transformants were screened. The results showed that the genetic transformation efficiency of *N. dimidiatum* was the highest, as high as 833 transformants / 10^6 conidia, when the OD_{600} of *A. tumefaciens* was 0.5, the germination time of conidia was 24 h, and the co-culture temperature was 25 °C. Two hundred transformants were randomly selected from the genetic transformation for screening, of which 3 transformants with different colony morphology, 4 with decreased spore production, 5 with increased spore production, and 6 with decreased pathogenicity were generated.

Keywords: pitaya stem canker; *Agrobacterium tumefaciens*-mediation; genetic transformation; screening

(责任编辑:罗启香 责任编辑:叶 静)