

多菌灵抗性基因转化哈茨木霉的研究

李 梅, 杨 谦, 李常银

(哈尔滨工业大学生命科学与工程系, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘 要: 将含有多菌灵抗性基因的质粒 pRB129 转化到哈茨木霉原生质体, 转化率为 $6 \sim 7 / 3 \mu\text{gDNA} / 2 \times 10^5$ 原生质体。转化子可以在 $1\,000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多菌灵浓度下正常生长, 并具有有丝分裂稳定性, 多菌灵抑制木霉和木霉转化子的微管蛋白的体外聚合作用, $5 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多菌灵对木霉微管蛋白聚合的抑制率约为木霉转化子抑制率的 2.5 ~ 3.5 倍。

关键词: 哈茨木霉; 多菌灵抗性基因; 原生质体; 转化率; 微管蛋白

中图分类号: X476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 – 2043(2003)04 – 0493 – 03

Transformation of Trichoderma T88 with Gene Resistant to Fungicide Carbendazim

LI Mei, YANG Qian, LI Chang-yin

(Department of Bioscience and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China)

Abstract: Method for protoplast preparation and DNA transformation of Trichoderma T88 were established. The protoplasts were transformed with plasmid pRB129, which carried carbendazim resistant gene, and the transformation frequency was about $6 \sim 7 \text{ transformants} / 3 \mu\text{gDNA} / 2 \times 10^5$ protoplasts. carbendazim – resistant transformants were obtained and could tolerate greater than $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ carbendazim. It has been indicated that they were mitotically stable on either selective or non – selective medium. Comparing to T88, the transformants grow slowly and show different levels of antagonism to plant pathogenic fungi.

Keywords: trichoderma T88; carbendazim resistant gene; protoplast; transformation frequency

在农业生产中, 化学农药的大量使用, 造成了一系列的环境问题, 同时植物病原菌的抗药性问题也十分突出。生物农药可直接取代部分化学农药, 避免化学农药造成的危害。多菌灵为一种内吸性苯丙咪唑类化学农药, 它可与真菌的 β – 微管蛋白结合, 抑制微管蛋白聚合, 从而抑制微管的形成, 破坏真菌的有丝分裂, 起到杀灭真菌的作用^[1]。多菌灵抗性基因编码的 β – 微管蛋白由于发生了碱基突变, 不能与多菌灵结合而使真菌具有了多菌灵抗性。哈茨木霉是植物病害生物防治中研究应用最多的拮抗菌, 已被用于防治水稻纹枯病、棉花立枯病, 花生、甜椒、茉莉等的白绢病、番茄幼苗的猝倒病等多种植物病害^[2], 具有广阔的开发前景。但该菌对多菌敏感, 因此在田间施用多菌灵时不能发挥生防效果。将多菌灵抗性基因导入木霉中, 使该菌与多菌灵同时应用于植物病害的综合防治, 有利于病害的防治和减少化学药剂的使用量,

有效地减少环境污染。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

哈茨木霉 (Trichoderma harzinum) 来自河北农业大学; 质粒 pRB129 含有多菌灵抗性基因 (Ben^r) 和氨苄青霉素抗性基因 (Ap^r), 来自美国斯坦福大学, 于 E. coli DH5 α 中扩增和保存。

1.2 木霉原生质体转化方法

见参考文献[3、4], 稍加改进。

1.3 转化子对多菌灵的抗性测定

将转化子分别在 10 、 100 、 $1\,000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多菌灵处理条件下培养, 检验对多菌灵的抗性。将转化子在不含多菌灵的 PDA 培养基上连续培养 10 代, 然后在上述不同浓度多菌灵处理条件下培养, 检验转化子的抗性稳定性^[5]。

1.4 微管蛋白提取方法

见参考文献[6], 稍加改进。

1.5 SDS – 聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白分子量测定

收稿日期: 2002 – 10 – 11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39400087 和 50178021)

作者简介: 李 梅(1972—), 女, 博士研究生。

E – mail: li-mei@mail. tsinghua. edu. cn

方法

见参考文献[7]。

1.6 微管蛋白的药剂结合实验

微管蛋白精制浓缩液冰浴中分别加入多菌灵,对照组不加,从冰浴中取出,迅速在 7500 紫外/可见分光光度计 350 nm 处调定为 0 点,然后将比色杯放 30 ℃ 水浴保温,于不同时间测 OD 值,25 min 后,将比色杯置冰浴,随时测 OD 值。比较 30 ℃ 保温 20 min 时 OD 值,及微管蛋白聚合抑制率^[8]。

微管蛋白聚合抑制率 = (1 - 药物组 OD/对照组 OD) × 100% 。

2 结果

2.1 哈茨木霉转化前对多菌灵的敏感性

将木霉原菌在不同浓度多菌灵的 PDA 培养基中于 25 ℃ 培养,结果见表 1。木霉对多菌灵的有效中浓度 EC₅₀ 为 0.306 μg · mL⁻¹。

表 1 不同浓度多菌灵对哈茨木霉的生长抑制率(%)

Table 1 Inhibition growth (%) of T. harzinum by carbendazim						
浓度 /μg · mL ⁻¹	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8
1	0	17.09	28.81	51.10	64.71	100
2	0	18.70	27.79	52.21	65.32	100
3	0	19.47	28.6	46.72	65.48	100
平均数	0	18.42	28.40	50.02	65.17	100
S _n - 1	0	1.214	0.539	2.903	0.406	0

表 2 原生质体转化正交实验分析

Table 2 Variance analysis of orthogonal test for transformation of protoplasts									
因素	位级			转化菌落数				因素主次	好位级
	1	2	3	T1	T2	T3	R		
转化温度/℃	0	20	30	2	11	7	9	1	2
PEG 种类	PEG3 000	PEG6 000	PEG8 000	5	8	7	3	3	3
PEG 浓度/%	25	33	35	6	8	6	2	4	2
Ca ²⁺ 浓度/mmol · L ⁻¹	10	20	50	10	5	5	5	2	1

表 3 木霉转化子 T1 与原菌株生长情况比较

Table 3 Comparison of growth (cm) of T. harzinum and transformants T1				
培养基		菌落生长情况(菌落半径 cm)		
		1 d	2 d	3 d
原菌株	PDA	1.35	2.65	4.05
T1	PDA	0.16	0.30	0.43
	PDA + 10 μg · mL ⁻¹ 多菌灵	0.17	0.31	0.45
	PDA + 100 μg · mL ⁻¹ 多菌灵	0.18	0.32	0.42
	PDA + 1 000 μg · mL ⁻¹ 多菌灵	0.16	0.32	0.45

注:表中数据为 3 次重复的平均值

利于抑制病原菌。本研究中的木霉转化子与原菌株相比,具有了极强的抗苯并咪唑类杀菌剂多菌灵的抗

2.2 不同转化条件对转化效率的影响

在文献报道的方法基础上,对部分转化条件进行了改进。采用正交设计研究转化温度、PEG 种类和浓度、Ca²⁺添加量对转化的影响,见表 2。在这 4 个因素中,对转化率影响表现为:转化温度> Ca²⁺浓度> PEG 种类> PEG 浓度。因此确定转化条件为:转化温度 20 ℃,PEG6 000 浓度为 30%,Ca²⁺浓度为 10 mmol · L⁻¹。重复试验结果表明,采用该处理条件获得的转化率可达 6 ~ 7/3μgDNA/2 × 10⁵ 原生质体。高于文献报道的 1/50μgDNA/2 × 10⁵ 原生质体的转化率。

2.3 对转化子的初步鉴定和抗药性测定

哈茨木霉转化 24 h 后,用 10 μg · mL⁻¹ 多菌灵药剂筛选,可产生抗多菌灵的木霉菌株,这些菌株均可在高于 10 μg · mL⁻¹ 多菌灵处理下正常生长,证明不是流产型转化子。选取一株转化子记为 T1,进行抗药性测定和抗性稳定性测定,结果表明,转化子在有无数多菌灵处理条件下均能正常生长,多菌灵处理浓度最高为 1 000 μg · mL⁻¹,见表 3,而原菌株在 0.8 μg · mL⁻¹ 多菌灵浓度下即不能生长,抗药性提高了 1 200 倍以上,足以与多菌灵同时应用于植物病害的防治。

根据表 3 结果,转化子 T1 的生长缓慢,与原菌株相比,生长速度下降了 90% 以上。木霉原菌株生长快速,在生物防治利用中,能迅速占据营养空间从而有

性,但生长缓慢,可能使病原菌生防效果发生变化。

将转化子在非选择培养基上连续培养 10 代,其抗性稳定不变,说明转化子获得的多菌灵抗性具有有丝分裂稳定性。

2.4 木霉和转化子 T1 微管蛋白的提取

木霉和 T1 的菌丝粗提液,经离心后取上清液,用 50% 饱和度的硫酸铵沉淀蛋白,再进行 DEAE - Sephadex A - 50 离子交换柱(2.6 cm × 30 cm)柱层析。根据 SDS - PAGE 结果,收集富含微管蛋白部分,经脱盐浓缩,得到部分纯化的微管蛋白提取液。α、β - 微管蛋白的分子量分别为 58kD 和 54kD。得到的

哈茨木霉和 T1 的微管蛋白提取液浓度分别为 75% 和 80% 左右。

2.5 多菌灵对微管蛋白聚合的影响

图 1(a) 显示不同浓度多菌灵在 30 ℃ 下影响木霉和 T1 微管蛋白聚合的浊度变化曲线。多菌灵对微管蛋白聚合有抑制作用, 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的多菌灵对毛壳菌和木霉微管蛋白聚合的抑制率分别为 66. 15% 和 64. 63%, 多菌灵浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 抑制率分别上升至 93. 85% 和 93. 90%, 见表 3。图 1(b) 显示多菌灵对 T1 微管蛋白聚合有一定的抑制作用。两种多菌灵浓度处理对 T1 微管蛋白聚合的抑制效果差异不明显, 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多菌灵抑制率分别为 24. 19% 和 27. 42%, 见表 3。

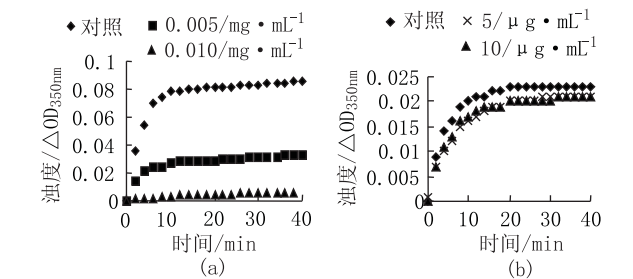


图 1 多菌灵对木霉和转化子 T1 微管蛋白聚合的影响
Figure 1 Influence of carbendazim to the polymeriation of tubulin from T. Harzinum and T1

表 4 30 ℃ 保温 20 min 时木霉和 T1 微管蛋白各多菌灵浓度处理微管蛋白聚合抑制率 (%)

Table 4 Inhibitory effects of different carbendazim concentrations to the tubulin polymerization at 30 ℃ with 20 min from T. harzinum and T1			
菌种	处理	$\Delta\text{OD}_{350\text{nm}}$	微管蛋白聚合抑制率/%
木霉	对照	0.082	
	多菌灵 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.029	64. 63
	多菌灵 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.005	93. 90
T1	对照	0.062	
	多菌灵 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.047	24. 19
	多菌灵 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.045	27. 42

3 结论与讨论

将多菌灵抗性基因转化到木霉中, 使之能够在 1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多菌灵处理条件下正常生长, 并具有较高的抗性稳定性, 因此能够用于与多菌灵同时使用进行植物病害的综合防治, 为该菌的进一步应用创造了条件。

木霉对病原菌的拮抗机理包括占领营养空间, 对病原菌的侵入、缠绕、分泌毒素等作用。哈茨木霉的生长速度快, 因此占领营养空间的作用十分突出, 而分

泌物的作用不明显。本文通过对转化子的研究发现, 木霉转化子 T1 生长速度明显低于原菌株, 能够产生大量的黄色分泌物, 对病原菌具有较强的拮抗作用(未发表)。

微生物细胞中微管蛋白含量较少, 采用部分纯化的微管蛋白, 可以减少微管蛋白的损失, 同时保证蛋白溶液中含有必要的微管“核”。浊度法检验微管蛋白的聚合特性, 方法简单, 并且能够在微管蛋白含量低的情况下测定。长期以来, 人们利用微管蛋白的药剂结合特性, 提取动物来源的微管蛋白, 进行药物的药理学研究^[9]。本文首次利用这一原理, 提取微生物来源的微管蛋白, 检验哈茨木霉及其转化子微管蛋白在多菌灵作用下的浊度变化, 反映木霉转化子和原菌株微管蛋白与多菌灵的结合特性, 进而从分子水平验证了多菌灵抗性基因已成功转化到木霉菌中并获得表达。根据本文研究结果, 转化子具有有丝分裂稳定性, 说明外源基因极有可能已整合到宿主基因组中。多菌灵抗性基因与细胞内 β -微管蛋白基因具有很高的同源性^[10], 转化后如采用常规的 Southern blot 检验外源基因, 还存在一定的问题, 有待于进一步研究。本文对哈茨木霉和转化子 T1 的微管蛋白的聚合特性进行了初步研究, 根据多菌灵对微管蛋白聚合的影响的结果, 在转化子中可能含有部分外源基因的表达蛋白, 同时存在原菌株的自身的蛋白。因此有必要对其含量和特性差异以及表达机制进行进一步的研究。

参考文献:

[1] 杨 谦. 植物病原菌抗药性概论[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995. 43 – 47.

[2] 王 芊. 木霉菌在生物防治上的应用及拮抗机制[J]. 黑龙江农业科学, 2001, (1): 41 – 43.

[3] Mark S G, Raymand J S L, Srirama B, et al. Pathogenicity and growth of Metarhizium anisopliae stably transformed to benomyl resistance[J]. Current genetic, 1990, 17: 129 – 132.

[4] 杨 谦, 赵小岩. 多菌灵抗性基因在木霉中的转化方法[J]. 科学通报, 1998, 43(22): 2423 – 2426.

[5] 李 梅, 杨 谦, 宋金柱. 多菌灵抗性基因在球毛壳中的转化[J]. 高技术通讯, 2002, 12(2): 43 – 45.

[6] Davidse L C, Flach W. Differential binding of methyl benzimidazol – 2 – yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of Aspergillus nidulans[J]. J Cell Biology, 1977, 72: 174 – 193.

[7] 杨国锋. 毕赤氏酵母 hGM/CFS 工程菌的构建及表达分析[D]. 华南热带农业大学硕士论文. 2001.

[8] 王昌俊, 陈伟, 胡月娟等. AC960 对微管蛋白聚合 – 解聚的影响[J]. 南京中医药大学学报, 1997, 13(5): 275 – 276.

[9] 宋志魁, 梁子清, 汪 旭. 2 – (4' – 噻唑) 苯并咪唑对猪脑微管蛋白体外聚合的影响[J]. 遗传, 2001, 23(3): 207 – 210.

[10] John V. Kilmartin. Purification of yeast tubulin by self – assembly in Vitro[J]. Biochemistry, 1981, 20, 3629 – 3633.