

纤维素降解球毛壳菌 NK-102 的高效遗传转化方法

郝晓冉, 纪元, 陈煌, 毕建男, 潘皎, 朱旭东*

南开大学生命科学学院微生物学系, 天津 300071

摘要: 【目的】在球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*) NK-102 中, 建立菌株特异性转化体系。【方法】构建新的抗性标记 pUCATPH-Pgap, 转化效率优于 pUCATPH 和 pCM768。建立了 PEG-原生质体和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 介导的两种转化方法。【结果】原生质体转化效率为 30-50 个转化子/10 μg DNA, 抗性标记 pUCATPH-Pgap 效率最高。EHA105 介导转化率达到 3.2×10^2 转化子/10⁷ 孢子。Southern blot 证明 DNA 随机整合于基因组中, 转化子抗性稳定。【结论】两种转化体系的建立为筛选高效利用纤维素的球毛壳菌突变株奠定了基础。

关键词: 球毛壳菌, 纤维素, 根癌农杆菌, 转化

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 11-1494-08

纤维素是植物体的主要成分, 是自然界中最丰富的有机物质。由于构造高度有序, 纤维素难以分解, 在自然界中主要以有机废物的形式存在^[1]。近年来, 能源危机的加剧, 环境的日益恶化使人们开始关注利用富含纤维素的有机物生产具有商业价值的产品, 例如: 乙醇、乙酸、单细胞蛋白等^[2-4]。筛选高效降解纤维素的微生物, 对于纤维素的充分利用具有重要意义。球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*) 就是一类分布广泛的可以利用纤维素的丝状真菌。早在 20 世纪 40 年代, Dorotheae Klemme 等就从棉纱中分离到球毛壳菌。球毛壳菌可以产生纤维素水解酶分解利用麦秸、咖啡豆、油棕榈树叶^[3]等。球毛壳还应用于生物防治, 同时, 有的球毛壳能够引起人畜感染。

球毛壳菌在生长过程中可以合成很多具有生物

活性的、抗真菌的次级代谢产物。这些次级代谢产物可以有效控制由禾旋孢腔菌 (*Cochliobolus sativus*) 引起的小麦斑枯病^[6]。球毛壳菌产生的 Chaetomugilin A、chaetomugilin D 和球毛壳菌素 A 还可以显著抑制米黑毛霉 (*Mucor miehei*) 的生长^[7]。从球毛壳菌 F0142 发酵产物中纯化的 Chaetoviridin A^[8], 在浓度为 62.5 μg/mL 时, 对稻瘟病和小麦叶锈病可以达到 80% 的控制; 在浓度为 125 μg/mL 时对番茄晚疫病可以达到 50% 的控制。球毛壳菌产生的球毛壳菌素 A、球毛壳菌素 B、secochaetomugilins A 和 D 能够抑制多种肿瘤细胞生长, 具有开发成为新型抗癌药物的潜在价值^[9-10]。球毛壳菌的基因组测序已经完成, 整个基因组包括大约 34.33 Mb, 11233 个基因。尽管球毛壳有重要应用价值, 对它的分子遗传学研究开展的不够深入, 大

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20100031120023); 天津市应用基础与前沿技术研究计划 (11JCYBJC09400); 国家“863 计划” (2007AA021501)

* 通信作者 Tel / Fax: +86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn

作者简介: 郝晓冉 (1983-), 女, 河北省人, 博士研究生, 主要从事分子真菌学研究。E-mail: hxrr_563@163.com

收稿日期: 2011-07-24; 修回日期: 2011-09-02

部分基因的功能还不清楚, 研究工具手段少。由于球毛壳菌代谢纤维素的能力和产生丰富的次级代谢产物的价值, 加大对该菌株的生物化学、基因组学、分子生物学等方面研究有一定意义。而建立高效的球毛壳菌转化体系, 是构建随机突变库, 进行功能基因组学研究的先决条件。

本实验室分离筛选到一株高效分解纤维素的球毛壳菌 NK-102 (未发表数据), 该菌株在以纤维素为唯一碳源的培养基中产生大量的球毛壳菌素 A, 最高可达 80 mg/L 发酵液。该菌株在利用可再生资源及天然活性产物的研究和开发有一定潜力。但是我们在摸索其遗传转化的过程中, 发现按照已报道的方法非常不能获得外援 DNA 的转化^[11-12], 说明球毛壳菌的转化与菌株来源有关, 即有菌株特异性。

本文建立了的球毛壳菌 NK-102 的两种 DNA 转化方法, 即原生质体转化法, 主要是构建了能够在 NK-102 中表达的三磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*gap*,

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 的强启动子潮霉素抗性标记基因 *Pgap-hph*。同时利用 *A. tumefaciens* EHA105 成功感染球毛壳菌 NK-102, 并建立了 T-DNA 随机插入突变库, 获得了几十个表型特异的突变体。本工作为今后研究球毛壳菌的分子生物学奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 球毛壳菌 (*C. globosum*) NK-102 为本实验室分离保存。*A. tumefaciens* AGL-1、LBA4404、EHA105 由南开大学生命科学院王勇、李明春教授惠赠, 培养在 LB (Luria-Bertanimedium)^[13] 添加抗生素 (链霉素, 100 mg/L; 利福平, 25 mg/L) 的培养基平板上。本文中用到的质粒列于表 1。

表 1 本文所用质粒

Table 1 Plasmids used in this work

Name	Description	Source
pUCATPH	An integrative plasmid carrying the hygromycin B phosphotransferase gene (<i>HPH</i>) initiated by the promoter of <i>trpC</i> from <i>Aspergillus nidulans</i>	[14]
pCM768	The <i>HPH</i> gene is initiated by the promoter of the <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> gene (<i>Pgap</i>) from <i>Ustilago maydis</i> .	[15]
pUCATPH- <i>Pgap</i>	<i>PtrpC</i> was replaced by the promoter <i>Pgap</i> from <i>C. globosum</i> NK-102	This work
pBI121- <i>HPH</i>	Shuttle plasmid for <i>Escherichia coli</i> and <i>Agrobacterium</i> , <i>HPH</i> gene promoted by <i>PtrpC</i> of <i>A. nidulans</i> . <i>HPH</i> , gained from pUCATPH through digestion with <i>Xba</i> I, was ligated to the <i>Xba</i> I site of the vector pBI121 between the left and right borders of the T-DNA ^[16] .	This lab

1.1.2 引物及试剂: 用于扩增 NK-102 三磷酸甘油醛脱氢酶基因启动子 *Pgap* 的引物由天津市翔天科技有限公司合成, 引物序列如下: Pro (s) (5'-CGCGGTACCGTGATTACTTATTGTTTACGTTGGG-3'); Pro (as) (5'-AATATCGATGCGGTGTAAGTGAGCT-GCTGTTCTTTTGG-3')。本实验所用链霉素、利福平、卡那霉素、潮霉素 B (Hygromycin B)、PEG、乙酰丁香酮 (Acetosyringone, AS) 等均购自北京鼎国生物试剂有限公司; 高效 DNA 地高辛标记和检测试剂盒 II 购自 Roche 公司。

1.2 NK-102 对潮霉素 B 的敏感性测试

将 NK-102 接种于含不同浓度 (50、100、150、200、250 mg/L) 潮霉素 B 的 PDA (Potato Dextrose Agar)^[13] 或者 MM^[17] (Minimal medium) 固体培养基上 28 °C 培养 6 d 后, 测量菌落直径并记录。

1.3 NK-102 孢子悬液的制备

在 PDA 平板上培养 10 - 15 d 的 NK-102 长出很多的孢子, 生理盐水洗下孢子, 2990 × g 离心 5 min, 弃上清 (主要为断裂的菌丝)。沉淀用生理盐水重悬, 震荡均匀, 再次离心弃上清, 沉淀重悬后, 血细胞计数板计数调整孢子浓度。

1.4 NK-102 原生质体转化

原生质体转化方法参阅 Turgeon 等^[12] 方法。取 1 mL NK-102 孢子悬液 (浓度为 10⁶ - 10⁷/mL) 接种至液体 PDA 中, 28 °C 摇床培养 2 - 3 d。离心收集菌丝, 无菌的蒸馏水洗涤菌体 3 次, 0.7 mol/L NaCl 洗涤菌体 1 次; 加入 20 - 30 mL 消化缓冲液 (0.7 mol/L NaCl, 8 mg/mL 蜗牛酶, 1 mg/mL 纤维素酶), 消化 2 h。纱布过滤原生质体, 将滤液转至 50 mL 离心管, 4 °C, 1914 × g 离心 10 min, 弃上清;

0.7 mol/L NaCl 洗沉淀,转化缓冲液 (Sorbitol transformation cushion, STC)^[12] 洗沉淀 2-3 次。STC 重悬菌体,细胞计数并调至 10^8 /mL。取 100 μ L 原生质体与 10-25 μ g DNA 混匀,静置。滴加 PEG3350-8000 冰浴 10 min。再生培养基^[12]与转化液混合倒平板,28 $^{\circ}$ C 过夜培养后,在再生培养基上面倒选择培养基(含有 200 mg/L 潮霉素 B 的 1% 水琼脂) 28 $^{\circ}$ C 培养 5-7 d。待长出转化子用菌丝尖端接种法接至 PDA (潮霉素 B, 100 mg/L) 平板上培养。

1.5 A. tumefaciens 介导的 NK-102 的转化

28 $^{\circ}$ C 培养 *A. tumefaciens* 至 OD_{600} 为 0.3-0.5, 离心收集菌体制备感受态细胞。液氮冻融法将质粒 pBI121-*HPH* 转化入感受态细胞中,在含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上筛选转化子。挑取单个转化子接种于 5 mL LB 液体培养基中(链霉素, 100 mg/L; 利福平, 25 mg/L, 卡那霉素, 50 mg/L), 28 $^{\circ}$ C 培养 16-24 h。取 1 mL 菌液,离心收集菌体,诱导培养基 (Induction medium, IM) 清洗菌体之后接种于 5 mL 含 200 μ mol/L AS 的 IM^[17] 中, 23 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600} \approx 0.5$ 。100 μ L 的 *A. tumefaciens* 与 100 μ L NK-102 孢子悬液 (10^7 /mL) 混合均匀^[18] 涂布在铺有微孔滤膜的含 200 μ mol/L AS 的 IM 平板上。23 $^{\circ}$ C 下共培养 48 h。将膜从 IM 转移至 PDA 或 MM 选择培养基(潮霉素 B, 100 mg/L; 头孢霉素, 100 mg/L)。28 $^{\circ}$ C 光照培养 5 d。揭膜,切单菌落至 PDA 或 MM 选择培养基上。

1.6 转化子遗传稳定性的检测

2 种转化体系得到的转化子中,随机分别挑选 10 个,单孢分离纯化后,在不含有潮霉素 B 的 PDA 培养基上传代 8 次,每代培养 5 d。将第 8 代转接到含有潮霉素 B (100 mg/L) 的 PDA 选择培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养数天,观察各转化子的生长情况。

1.7 转化子 Southern blot 检测

NK-102 转化子基因组的提取按照 Raeder PB^[19] 的方法进行。Southern blot 按照试剂盒提供的方法进行。对于每株转化子 2 μ g 没有酶切的基因组 DNA 和 5 μ g 的 *Hind*III 完全酶切的基因组 DNA 分别进行转膜。用于杂交的探针是来源于质粒 pUCATPH 且经 *Cla*I-*Bam*HI 酶切的 1 kb 的 *HPH* 基因。

2 结果

2.1 潮霉素 B 对 NK-102 的最小抑制浓度

将 NK-102 接种于含不同浓度潮霉素 B 的 PDA 及 MM 固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养 6 d 后,生长情况如表 2 所示。

表 2 *C. globosum* NK-102 对潮霉素 B 的敏感性

Table 2 Assay on hygromycin B sensitivity for NK-102

Medium	c (Hygromycin B) / (mg/L)					
	0	50	100	150	200	250
PDA	+++	++-	+-	-	-	-
MM	+++	+++	+++	++-	+-	-

The hyphal growth inhibition used for quantitative estimations were divided into four classes (-, +, ++, +++) according to the diameter of the colonies. The symbol “-” shows the growth of the strain was completely inhibited by the hygromycin B.

如表 2 所示, PDA 平板上,潮霉素 B 浓度在 100 mg/L 时就能抑制 NK-102 的生长。MM 平板上,潮霉素 B 浓度在 250 mg/L 时才能抑制 NK-102 的生长。因此,我们以含 100 mg/L 潮霉素 B 的 PDA 培养基平板作为 NK-102 遗传转化的筛选培养基。

2.2 NK-102 原生质体转化体系的优化

2.2.1 酶作用温度对原生质体释放量的影响:将相同重量的菌体悬浮于相同体积的消化缓冲液中,分别置于 25 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、31 $^{\circ}$ C、34 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 温浴 2 h,然后纱布过滤并离心滤液收集原生质体,细胞计数比较不同温度下原生质体释放量。如图 1-A 所示,温度越高,原生质体释放量越多,34 $^{\circ}$ C 时达到最高;但是菌体在 37 $^{\circ}$ C 消化 2 h,所获得的原生质体反而减少,如图 1-A 所示。

2.2.2 DNA 与原生质体共浴的时间及温度对转化效率的影响:将原生质体和质粒 DNA 混合后,不同的处理时间和温度所获得的转化子数差异显著(表 3)。

表 3 共培养时间和温度对转化的影响

Table 3 Effects of time and temperature of incubation on transformation

T/ $^{\circ}$ C	t/min			
	10	20	30	40
RT ^a	- - ^b	-	13-15 ^c	-
0	6-8	10-12	35-37	9-11

^aA mixture of 10^7 protoplasts and 10 μ g pUCATPH-*Pgap* was kept at 28 $^{\circ}$ C. ^bNo transformant was obtained. ^cThe number of transformants obtained.

转化混合物共培养时间以 30 min 最佳,时间过

长或过短都对转化不利。时间短,可能 DNA 还未与原生质体充分接触;时间过长,原生质体质量可能下降,再生能力降低,最终得到的转化子数目减少。相同共培养时间条件下,冰上放置比室温效果要好。

2.2.3 PEG 对转化效率的影响:通过改变 PEG 的种类 (PEG3350、PEG4000、PEG6000、PEG8000) 及浓度 (40%、50%、60% w/v),对原生质体转化条件进行优化。实验证明,相同条件下使用 60% 的 PEG3350 所得到的转化子最多(图 1-B、C)。利用优化的转化方法,转化效率达到 3-5 个转化子/ μg DNA。

2.2.4 筛选标记基因启动子对转化效率的影响:3

种质粒 (pUCATPH、pUCATPH-P_{gap}、pCM768) 在相同的处理方法下分别转化 NK-102,培养 5 d 后,观察各个平板上菌落生长情况,发现用 pUCATPH 转化的平板上长出的菌落大小各异,转接至筛选培养基上生长 3 d,大部分为假阳性。如图 1-D 所示,只有箭头所指的菌落为阳性菌落,在潮霉素 B 抗性平板上生长良好。用 pUCATPH-P_{gap} 转化 NK-102 也得到大量的转化子,经验证都为阳性菌株。用 pCM768 转化 NK-102 却没有转化子生长出来。上述结果表明,转化子筛选标记基因的启动子对转化效率有很大的影响,不同来源的启动子表达差异显著。

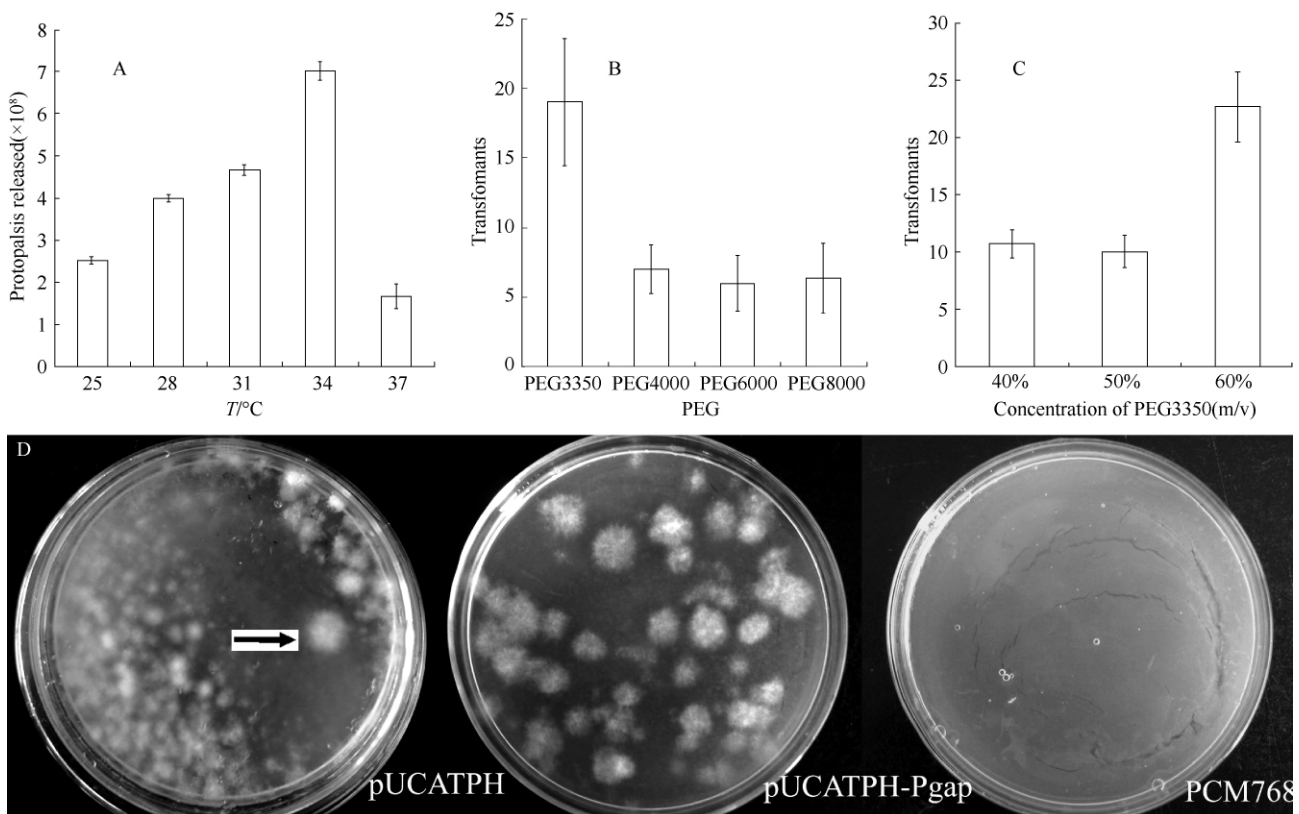


图 1 *C. globosum* NK-102 的原生质体转化

Fig. 1 Protoplast transformation of *C. globosum* NK-102. A: The optimal temperature for protoplast formation. The mycelia were digested in 20 mL enzyme mixture at various temperatures for 2 h. B: Effects of various PEG on the transformation efficiency. The mixture of 10^7 protoplasts and 10 μg pUCATPH-P_{gap} was incubated at room temperature for 10 min. The concentration of PEG was 60% (w/v). C: Effects of various concentrations of PEG3350 on the transformation efficiency. D: *C. globosum* NK-102 transformants obtained by protoplast transformation using different plasmids. The arrow indicates the only positive transformant with pUCATPH plasmid.

2.3 *A. tumefaciens* EHA105 介导 NK-102 转化体系的建立

A. tumefaciens AGL-1、LBA4404、EHA105 分别用于 NK-102 的转化。AGL-1、LBA4404 无法成功地

介导 NK-102 的转化。改变转化条件,如:AS 的浓度、共培养的时间和温度、农杆菌与孢子的比例等等,也没有得到任何转化子。从实验室原有菌种 LBA4404-HPH 中提取已构建好的双元载体质粒

pBI121-*HPH*, 采用液氮冻融法将其导入到 *A. tumefaciens* EHA105 感受态细胞中, 得到重组 *A. tumefaciens* EHA105-*HPH*。 *A. tumefaciens* EHA105-*HPH* 成功介导 NK-102 的转化, 转化率约为 3.2×10^2 转化子/ 10^7 孢子。(图 2-A)。

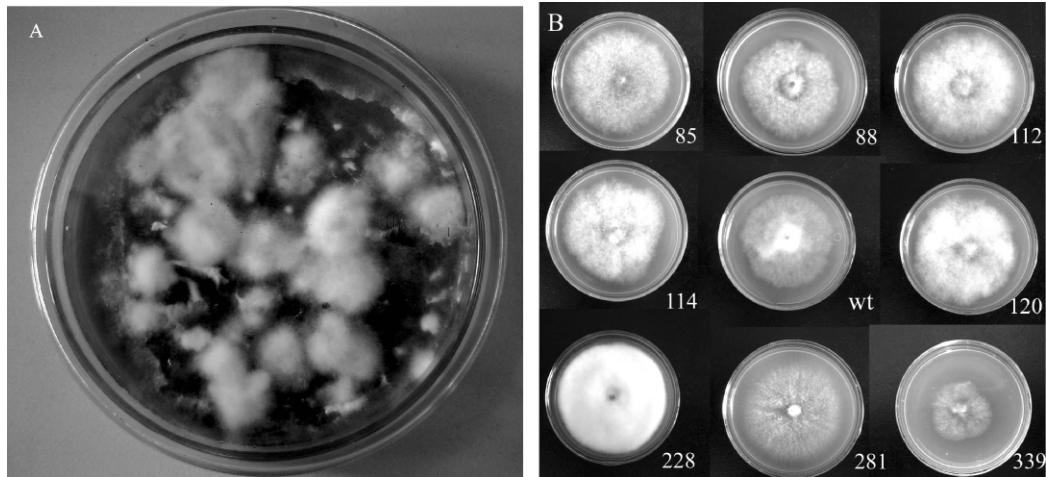


图 2 根癌农杆菌介导的 *C. globosum* NK-102 的转化

Fig. 2 *Agrobacterium*-mediated DNA transformation (ATMT) of *C. globosum* NK-102. A: *C. globosum* NK-102 transformants obtained by *A. tumefaciens* EHA105-mediated DNA transformation. B: Phenotypic change in transformants from ATMT. The yield of chaetoglobosin A drops dramatically in the fermentation broth of mutants 112, 114, 120, or 339, by ATMT (data not shown).

2.4 转化子的遗传稳定性

2 种转化体系得到的转化子中, 随机分别挑选 10 个转化子, 单孢分离纯化, 在不含有潮霉素 B 的 PDA 培养基上传代 8 次, 每代 28 °C 培养 5 d。然后转接至含有潮霉素 B 的 PDA 选择培养基上, 28 °C 培养数天, 观察发现转化子菌落仍能生长, 成活率为 100%, 并且菌落生长状态无变化。说明在无潮霉素选择压力的条件下, 转化子依然保持潮霉素 B 的抗性, 表明其能稳定传代。

2.5 Southern blot 分析及随机突变库的建立

从两种转化体系得到的转化子中, 各挑选 5 株菌 (P1、P5、P12、P19、P28; 88、100、228、275、325), 单孢分离纯化之后, 提取基因组。每个样品分两种处理, 不酶切及 *Hind*III 酶切。毛细管法转膜之后, *HPH* 基因作为标记探针, 进行杂交。结果发现, 所有转化子产生信号带 (图 3-A), 说明 DNA 成功整合进 NK-102 的基因组中。酶切的基因组 (图 3-B) 也都有信号, 说明 DNA 是以整合的方式存在于基因组中, 而不是染色体外独立存在。2 种方法都成功实现了对 NK-102 进行转化。

研究发现, 无论用 PDA (含有 AS) 还是 IM (含有 AS) 培养基作为诱导培养基, 都可以获得转化子, 但是, 以 IM (含有 AS) 作为诱导培养基获得的转化子数量是原来的 1.2 倍。此外, 含有潮霉素 B 的 PDA 作为筛选培养基得到的转化子数目更多, 是 MM 的 2-3 倍。

从图 3-B 发现, ATMT 转化方法得到的转化子更多的是单拷贝插入, 利用 ATMT 转化方法的这个优点, 建立了 NK-102 随机突变库, 并得到一些表型特异的转化子 (图 2-B)。

3 讨论

本文建立并优化了 *C. globosum* NK-102 高效、重复性好的转化体系。传统的原生质体破壁需要多种酶消化, 通过实验我们优化了原生质体产生条件, 通过选择合适的作用温度, 只需要蜗牛酶和纤维素酶共同作用, 就可以得到 $10^8 - 10^9$ /mL 的原生质体, 足够转化所需。大大减少了酶的种类和用量, 为其他真菌原生质体转化条件优化提供新的思路。本文就筛选标记基因启动子对转化效率的作用进行了摸索比较, 不同来源的启动子转化差异显著, 利用 NK-102 来源的强启动子控制 *HPH* 基因可以获得更多的转化子, 且假阳性现象很少。利用优化的原生质体转化方法, 转化效率大约为 30-50 个转化子/ $10 \mu\text{g}$ DNA。

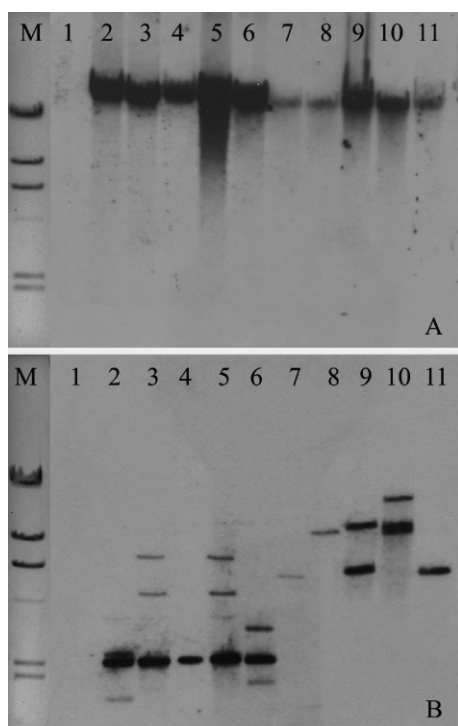


图3 转化子的 Southern blot 分析

Fig. 3 Southern blot analysis of the transformants. A DIG-labeled 1-kb *ClaI*-*Bam*HI fragment of plasmid pUCATPH, corresponding to the *HPH* gene cassette was used as probe. A: Genomic DNA without digestion. M: λ -DNA *Hind*III Marker, the stripes were 23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp and 2027 bp. lane 1: wild-type; lanes 2-6 contained were p1, p5, p12, p19, and p28 by the protoplast transformation; and lanes 7-11 were transformants 88, 100, 228, 275, and 325 by ATMT. B: Genomic DNA was digested with *Hind*III, and the fragments were separated on agarose gels. M: λ -DNA *Hind*III Marker, the stripes were 23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp and 2027 bp. Lane 1 was wild-type; lanes 2-6 contained the DNA of transformants p1, p5, p12, p19, and p28 by protoplast transformation; and lanes 7-11 contained the transformants 88, 100, 228, 275, and 325 by ATMT.

高兴喜、杨谦利用 *A. tumefaciens* AGL-1 实现了球毛壳菌的遗传转化^[11]。然而,在本实验中,无论如何改变条件,包括 AS 浓度、供体受体浓度及比例、共培养温度、共培养时间等 *A. tumefaciens* AGL-1 (a succinamopine type)、*A. tumefaciens* LBA4404 (an octopine type) 都不感染 NK-102。我们利用 *A. tumefaciens* EHA105 (an *L. L.*-succinamopine type) 成功感染 NK-102, 得到大量的转化子, 这说明不同的球毛壳菌株对根癌农杆菌不同菌株的感受性不同, 造成转化效率的差异。Jube^[20] 用 3 种不同的农杆菌 (LBA4404, EHA105, and C58C1) 转化银合欢

(*Leucaena sp.*), 只有 C58C1 (a nopaline type) 成功实现了转化。Newell^[21] 发现 LBA4404 可以使白花菜子 (*Cleome gynandra* L.) 移植体在再生培养基上长出转化组织, EHA105 却不能。LBA4404 可能更有利于转化嫩枝的再生。Dandekar 等在苹果上研究发现, 不同农杆菌株系致病能力差异很大。而农杆菌对寄主细胞的致病力主要受其携带的原质粒上的 *Vir* 区的 6 组基因 (*VirA*, *VirB*, *VirC*, *VirD*, *VirE*, *VirG*) 控制。T-DNA 从农杆菌转移至植物细胞受到 Ti 质粒 (Tumor-inducing plasmids) 上 *vir* 基因^[22] 的调控。因此, 本实验结果可能是根癌农杆菌毒力差异造成的。影响根癌农杆菌的毒力的因素有很多。章鱼碱和胭脂碱型菌株中 *vir* 基因的有效诱导需要各自 Ti 质粒^[23] 上的 *virA*, *virG*, 及 *vir* boxes 协同作用。ChvE 可以特异地与 *vir* 基因诱导物-D-葡萄糖高效结合从而影响农杆菌的毒力。ChvE 蛋白横跨 N-端和 C-端的延伸区域在与 *VirA*^[24] 作用中也表现的非常重要。*A. tumefaciens* NTL4 中的 *fur* 基因 (ferric uptake regulator)^[25] 发生突变, 可以明显降低该菌株感染烟草叶子的能力。综上所述, 筛选适宜的农杆菌菌株对提高目标真菌的转化成功率至关重要。

C. globosum NK-102 高效转化体系的建立和优化、随机突变库的建立, 对研究该菌株代谢调节机制及提高分解纤维素的能力, 构建高效木质纤维素利用真菌有促进作用。

参考文献

- [1] Blanchette R. A review of microbiological deterioration found in archeological wood from different environments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2000, 46: 189-204.
- [2] Demain AL, Newcomb M, David Wu JH. Cellulase, clostridia, and ethanol microbial. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69: 124-154.
- [3] Valentin L, Kluczek-Turpeinen B, Willför S, Hemming J, Hatakka A, Steffen K, Tuomela M. Scots pine (*Pinus sylvestris*) bark composition and degradation by fungi: Potential substrate for bioremediation. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 2203-2209.
- [4] Adsul MG, Bastawde KB, Varma AJ, Gokhale DV. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM1171 for increased cellulase production. *Bioresource Technology*, 2007, 98(7): 1467-1473.

- [5] Umikalsom MS , Ariff AB , Shamsuddin ZH , Tong CC , Hassan MA , Karim MIA. Production of cellulase by a wild strain of *Chaetomium globosum* using delignified oil palm empty-fruit-bunch fibre as substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 1997 , 47 : 590-595.
- [6] Aggarwall R , Tewari AK , Srivastava KD , Singh DV. Role of antibiosis in the biological control of spot blotch (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia* , 2004 , 157 : 369-377.
- [7] Qin JC , Zhang YM , Gao JM , Bai MS , Yang SX , Laatsch H , Zhang AL. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum* , an endophytic fungus isolated from Ginkgo biloba. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* , 2009 , 19 : 1572-1574.
- [8] Park JH , Choi GJ , Jang KS , Lim HK , Kim HT , Cho KY , Kim JC. Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum*. *FEMS Microbiology Letters* , 2005 , 252 : 309-313.
- [9] Ge HM , Zhang WY , Ding G , Saparpakorn P , Song YC , Hannongbua S , Tan RX. Chaetoglobins A and B , two unusual alkaloids from endophytic *Chaetomium globosum* culture. *Chemical Communications* , 2008 , 45 : 5978-5980.
- [10] Yamada T , Muroga Y , Tanaka R. New Azaphilones , Seco-Chaetomugilins A and D , Produced by a Marine-Fish-Derived *Chaetomium globosum*. *Marine Drugs* , 2009 , 7 : 249-257.
- [11] 高兴喜 , 杨谦. 根癌农杆菌介导的球毛壳菌遗传转化及 T-DNA 插入突变体的获得. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*. 2005 , 45 : 129-131.
- [12] Turgeon BG , Garber RC , Yoder OC. Development of fungal transformation systems based on selection of sequences with promoter activity. *Molecular Cell Biology* , 1987 , 7 : 3297-3305.
- [13] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning*. 3rd Ed. Beijing: Science Press 2002.
- [14] Lu SW , Lyngholmt L , Yang G , Bronsont C , Yoder OC , Turgeon BG. Tagged mutations at the tox1 locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* , 1994 , 91 : 12649-12653.
- [15] Kojic M , Holloman WK. Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Canadian Journal of Microbiology* , 2000 , 46 : 333-338.
- [16] Chen S , Jin W , Wang M , Zhang F , Zhou J , Jia Q , Wu Y , Liu F , Wu P. Distribution and characterization of over 1000 T-DNA tags in rice genome. *Plant Journal* , 2003 , 36 : 105-113.
- [17] Hooykaas PJJ , Roobol C , Schilperoort RA. Regulation of the transfer of Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of General Microbiology* , 1979 , 110 : 99-109.
- [18] Groot MJ de , Bundock P , Hooykaas PJ , Beijersbergen AG. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* , 1998 , 16 : 839-842.
- [19] Raeder PB. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* , 1985 , 1 : 17-20.
- [20] Jube S , Borthakur D. Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for the tree-legume *Leucaena leucocephala* using immature zygotic embryos. *Plant Cell , Tissue and Organ Culture* , 2009 , 96 : 325-333
- [21] Newell CA , Brown NJ , Liu Z , Pflug A , Gowik U , Westhoff P , Hibberd JM. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Cleome gynandra L.* , a C₄ dicotyledon that is closely related to *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* , 2010 , 61 : 1311-1319.
- [22] Gelvin SB. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” tool. *Microbiology Microbiology and Molecular Biology* , 2003 , 67 : 16-37.
- [23] Krishnamohan A , Balaji V , Veluthambi K. Efficient *vir* gene induction in *Agrobacterium tumefaciens* requires *virA* , *virG* , and *vir* box from the same Ti plasmid. *Journal of Bacteriology* , 2001 , 183 : 4079-4089.
- [24] He FL , Nair GR , Soto CS , Chang Y , Hsu L , Ronzone E , DeGrado WF , Binns AN. Molecular basis of ChvE function in sugar binding , sugar utilization , and virulence in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* , 2009 , 191 : 5802-5813.
- [25] Kitphati W , Ngok-ngam P , Suwanmaneerat S , Sukchawalit R , Mongkolsuk S. *Agrobacterium tumefaciens fur* has important physiological roles in iron and manganese homeostasis , the oxidative stress response , and full virulence. *Applied and Environmental Microbiology* , 2007 , 73 : 4760-4768.

Two optimized transformation protocols for a cellulose-utilizing fungus *Chaetomium globosum* NK-102

Xiaoran Hao, Yuan Ji, Huang Chen, Jiannan Bi, Jiao Pan, Xudong Zhu*

National Key Program of Microbiology, Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: [Objective] We developed the transformation methods of the strain *Chaetomium globosum* NK-102. [Methods] We constructed plasmid pUCATPH-Pgap and compared the transformation efficiency with pUCATPH and pCM768. We established the PEG mediated protoplast transformation and *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 mediated transformation methods. [Results] In protoplast approach, approximately 3–5 transformants/ μg DNA could be obtained. The highest efficiency of transformation was obtained by employing pUCATPH-Pgap. *A. tumefaciens* EHA105 successfully mediated T-DNA insertion into the genome of *C. globosum* NK-102 and the transformation rate was 3.2×10^2 transformants/ 10^7 spores. The transformants retained stable after generations. Southern blot analyses confirmed that the DNA had integrated into the chromosomal DNA of *C. globosum* NK-102. [Conclusion] The transformation systems were good basis for selection of *C. globosum* mutant strains that effectively utilizing cellulose.

Keywords: *Chaetomium globosum*, cellulose, *Agrobacterium tumefaciens*, transformation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the specialized Research Fund for the Doctoral program of Higher Education of China (20100031120023), by the Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (11JCYBJC09400) and by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA021501)

* Corresponding Author. Tel / Fax: + 86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn

Received: 24 July 2011 / Revised: 2 September 2011

《微生物学报》投稿方式

从 2006 年起, 本刊采用“稿件远程处理系统”, 全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿: 请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿, 请先进行“注册”, 注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿, 则可直接投稿。如果忘了用户名和密码, 请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执: 编辑部看到远程投稿后, 当日或者次日给作者发“收稿回执”, 通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审: 编辑看到远程投稿后, 还要对稿件进行内审。内审会有 2 个结果, 直退或受理, 请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 邮寄纸样: 为了保护知识产权, 务必请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板); 为了核实文中的图、表等内容, 还需要提供一份纸质稿件。
- (5) 受理费: 100 元审稿费。按照“稿件受理通知”中提供的详细地址办理, 务必通过邮局汇款, 切忌夹在纸样材料中随信邮寄! 【为了便于查找, 请在汇款单上注明“稿件编号”。】