

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53 (11):1233 - 1239; 4 November 2013
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

农杆菌介导的粘帚菌遗传转化

王艳玲¹, 胡鹏杰¹, 李二伟¹, 刘杏忠¹, 车永胜², 刘钢^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 真菌学国家重点实验室, 北京 100101

²中国军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

摘要: 【目的】建立分离自西藏林芝的能够产生一系列具有抗肿瘤活性的二酮哌嗪类化合物 (epipolythiodioxopiperazine, ETP) 的一株冬虫夏草定殖真菌——粘帚菌 (*Gliocladium* sp.) 6.102 的遗传转化体系。【方法】利用农杆菌介导的方式建立了粘帚菌的遗传转化体系; 用正交试验研究了影响转化效率的因素, 包括共培养所用农杆菌与真菌孢子的比例、共培养的时间、pH 值和乙酰丁香酮的浓度。【结果】成功建立了农杆菌介导的粘帚菌的遗传转化体系, 得到了转化的最佳条件, 其转化效率为 50 - 100 个转化子/10⁶ 真菌孢子。通过农杆菌介导的方式分别将潮霉素 B 磷酸转移酶基因 (*hph*) 和绿色荧光蛋白基因 (*egfp*) 转入粘帚菌中, 实现了表达并且可以稳定存在。【结论】首次建立了农杆菌介导的粘帚菌遗传转化体系, 为研究 ETP 化合物的生物合成及其调控机制奠定了基础。

关键词: 粘帚菌, 农杆菌介导的遗传转化, 绿色荧光蛋白

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 11-1233-07

粘帚菌 (*Gliocladium* sp.) 为子囊菌的丝状真菌, 大多为植物内生菌。粘帚菌 6.102 菌株是从西藏林芝采集的冬虫夏草的子实体中分离得到的, 它与冬虫夏草分享相同的生长环境和营养, 并且共同抵御逆性的环境, 因此被称为冬虫夏草定殖真菌^[1]。粘帚菌在大米培养基上发酵可以产生两种已知的二酮哌嗪类的化合物 11'-deoxyverticillin A 和 11, 11'-dideoxyverticillin, 两种新结构的二酮哌嗪类的化合物 gliocladicillins A 和 B 以及一个新的对三联苯的派生物 gliocladinins A 和 B^[1-3]。其中 11, 11'-dideoxyverticillin 是磷酸激酶的抑制剂并具有抗肿瘤的活性^[4-5]。Gliocladicillins A 和 B 可以通过内源性和外源性的途径来抑制肿瘤细胞 HeLa,

HepG2 和 MCF-7 的生长和诱导肿瘤细胞的凋亡^[2]。但是在粘帚菌中, 这些化合物的产量极低, 其合成途径也不清楚。通过定向遗传改造是提高次级代谢产物产量的一个重要途径, 但目前在粘帚菌中尚没有可用的遗传转化方法。农杆菌介导的遗传转化 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 作为有效的方法已经在很多真菌的遗传转化中被广泛运用^[6], 但是不同真菌的遗传转化效率不同, 也需要筛选适宜的选择标记^[7]。ATMT 的转化效率主要受以下几个因素的影响: 真菌起始材料的类型和浓度、细菌的浓度、共培养的时间和 pH 值^[6-8]。在本实验中, 我们通过 ATMT 的方法构建了粘帚菌 6.102 菌株的遗传转化体系, 为我们研究

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX2-EW-J-6)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807892; Fax: +86-10-64806017; E-mail: liug@im.ac.cn

作者简介: 王艳玲 (1987-) 河北人, 硕士研究生, 主要从事丝状真菌次级代谢研究。E-mail: wangyanling2008ok@126.com

收稿日期: 2013-04-07; 修回日期: 2013-05-31

ETP 类化合物的生物合成途径及其调控机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:粘帚菌 (*Gliocladium* sp.) 6.102 是从西藏林芝采集的冬虫夏草的子实体中分离的产生 ETP 类化合物的野生型菌株 (编号 XZC04-CC-302)。农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) AGL-1, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和 JM109 为本实验室保存。克隆载体 pEasy-Blunt 购自 TranGene 公司。质粒 pAg1-H3 由美国宾州州立大学 (Penn State University, USA) 的 Seogchan Kang 教授惠赠。含有绿色荧光蛋白基因的质粒 pchiGFP-Cell 由中国科学院微生物研究所的金城研究员惠赠。

1.1.2 菌株培养基和培养条件:LPE 培养基^[9]用于粘帚菌产孢培养。TSA 培养基^[9]、GYE 培养基 (1L:15 g glucose, 3 g yeast extract) 和 PDA 培养基用于粘帚菌的生长培养。TSA 和 PDA 培养基加入合适浓度的抗生素做转化子的筛选培养基。LB 培养基用于大肠杆菌的培养,必要时加入合适浓度的抗生素。粘帚菌在 28 $^{\circ}$ C 培养,大肠杆菌在 37 $^{\circ}$ C 培养。农杆菌转化所用的培养基为基本培养基 (MM)、诱导培养基 (IM) 和共培养培养基 (CM)^[9]。

1.1.3 引物:本研究中所用的引物见表 1。

表 1. 本研究中所使用的引物

Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5' \rightarrow 3')	Size /bp
EGFPF	GGCGCGCCATGAGTAAAGGAGAAG	24
EGFPF	GGACGTCCTTATTGTATAGTTCATCCATGCC	32
HphF	TCGTTATGTTTATCGGCACCTT	22
HphF	TCGGCATCTACTCTATTCTCTTTG	23

1.1.4 主要试剂和仪器:潮霉素 B (北京鼎国公司); 噻孢霉素 (北京江晨公司); 卡那霉素 (北京江晨公司); G418 (Amresco 公司); 博莱霉素 (Sigma 公司); 乙酰丁香酮 (上海生工生物公司); 蛋白酶抑制剂 (Merck 公司); SuperSigna West Pico Chemiluminescent Substrate Pierce (Thermo); PCR 相关试剂购自 TaKaRa 公司,其他常规试剂均为国产分析纯产品。引物由 Invitrogen 公司合成;DNA 测

序由博尚生物公司 (北京) 完成。恒温摇床 (江苏太仓) 和生化培养箱 (上海博迅实业有限公司); PCR 仪 (BioMetra)。绿色荧光蛋白一抗抗体购自北京康为世纪生物公司,二抗抗体购自 Jackson 生物有限公司 (上海)。

1.2 PCR 条件

用 Pyrobest DNA 聚合酶扩增绿色荧光蛋白基因 (*egfp*), 用 rTaq DNA 聚合酶扩增潮霉素 B 磷酸转移酶基因 (*hph*)。PCR 条件:95 $^{\circ}$ C 10 min 变性后,扩增 30 个循环 (95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min), 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。

1.3 质粒构建

利用引物 EGFPF 和 EGFPF, 以 pchiGFP-Cell 质粒为模板扩增 *egfp* 基因。扩增产物被克隆到 pEasy-Blunt 载体上,得到了 pEasy-egfp 质粒。对亚克隆片段进行测序和验证。用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Kpn*I 酶切 pEasy-egfp 质粒,得到一个 843 bp 含有完整 *egfp* 基因的 DNA 片段。用 *Sac*I 和 *Xba*I 酶切质粒 pAC::TrpC^[10], 获得一个 359 bp 含有 TrpC 启动子的 DNA 片段。将 *egfp* 基因和 TrpC 启动子与含有 *Sac*I/*Kpn*I 酶切位点的质粒 pBHt2^[10] 连接得到质粒 pBTG。

1.4 真菌转化

将 pAg1-H₃ 或 pBTG 通过氯化钙法^[9] 转化农杆菌 AGL-1, 对获得的转化子通过 PCR 进行验证。将验证正确的转化子接到含有卡那霉素 (75 μ g/mL) 的 MM 培养基中,在 28 $^{\circ}$ C 培养 2 d。将 MM 培养基的菌液接入到 IM 培养基中,使 IM 培养基中的菌体浓度为 $OD_{600} = 0.15$, 在 28 $^{\circ}$ C 培养大约 6 h 至菌体浓度为 $OD_{600} = 0.6$ 。用无菌水将 LPE 培养基上的粘帚菌孢子洗下,收集孢子,使其浓度为 1×10^7 个/mL。将 IM 培养基中的菌液与孢子悬液混合涂到 CM 培养基上,在 24 $^{\circ}$ C 黑暗条件下培养。培养 3d 后,将 CM 培养基上的混合菌体转移到含有潮霉素 B (200 μ g/mL) 和噻孢霉素 (500 μ g/mL) 的 TSA 培养基上,28 $^{\circ}$ C 继续培养 4-5d。长出的转化子挑到含有 PDA 培养基的 24 孔板培养。

为了找到转化的最适条件,我们做了四因素 3 水平的正交试验 (表 2), 并且每个实验有 3 个平行, 2 次重复。实验的设计和分析采用正交设计助手 II 3.1. 软件。

表 2. 四因素三水平正交试验表

Table 2. Factors and levels of parameters used in orthogonal experiment design for fungal transformation test

Factors	Co-cultivation period / d	<i>A. tumefaciens</i> volume / μL	<i>c</i> (Acetosyringone) / ($\mu\text{mol/L}$)	pH
Level one	2	200	200	5.0
Level two	2.5	400	400	5.3
Level three	3	800	800	5.8

1.5 基因组 DNA 的提取和转化子的验证

将获得的粘帚菌转化子接到 2 mL GYE 培养基中, 在 28°C 培养 2 d。收集菌体, 用高通量组织研磨器将菌体打碎。用 400 μL TPS 溶液 (100 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 10 mmol/L EDTA pH8.0, 1 mol/L KCl) 重悬菌体; 在 75°C 温浴 20 min; 13523 \times g 离心 10 min; 在上清中加入等体积的异丙醇, -20°C 沉淀 20 min; 1503 \times g 离心 10 min; 用 70% 无水乙醇洗 2 次; 加入适量的 ddH₂O 溶解。用引物 HphF 和 HphR 来扩增转化子的 *hph* 基因来验证转化子的正确与否。

1.6 显微和荧光观察

在 TSA 培养基上做插片实验来观察粘帚菌的生活周期, 每隔 6 h 镜检一次。在 Olympus BX51 显微镜 (Olympus, Japan) 的 40 倍物镜下观察菌体的生长情况。用 Canon EOS 450D 相机拍摄照片, 进行记录。

含有绿色荧光蛋白基因 (*egfp*) 的转化子在 LPE 培养基上培养, 并收集孢子。将孢子接到 TSA 培养基上做插片实验。在 28°C 培养 6-12 h 后, 在 450-490 nm 波长下用 Zeiss Axio imager A1 荧光显微镜 (Carl Zeiss, Germany) 观察荧光。显微成像用含有 Axiovision Release 4.8.2 软件的 Zeiss AxioCam MR 相机。

1.7 Western blot 实验

分别将粘帚菌野生株和转化子在 TSA 培养基上培养 2 d 后收集菌体。用液氮研磨后, 用 600 μL 磷酸盐溶液 (100 mmol/L Tris-HCl, 0.01% SDS, 1 mmol/L DTT pH 7.5) 重悬菌体, 并加入 10 μL 蛋白酶抑制剂; 混合液在 4°C, 13523 \times g 离心 15 min; 取上清 (含有菌体全蛋白) 备用。全蛋白用 12% SDS-PAGE 电泳分离, 转膜; 用 7% 脱脂奶粉封闭 2h; 将一抗加入 PDVF 膜, 并温育 1 h; 加入含有辣根过氧化物酶的兔抗鼠的二抗; 用 Pierce 公司的化学发光试剂盒曝光, 检测蛋白表达情况。

2 结果

2.1 粘帚菌形态特征观察

粘帚菌 6.102 属于子囊菌类的丝状真菌, 其生长和形态分化如图 1 所示。在 TSA 培养基上, 粘帚菌孢子大约经 6 h 萌发, 极性生长, 72 h 左右开始产生帚状分枝, 形成孢子梗并产生分生孢子, 其后成熟的孢子从孢子梗上脱落下来, 进入下一个生命周期。

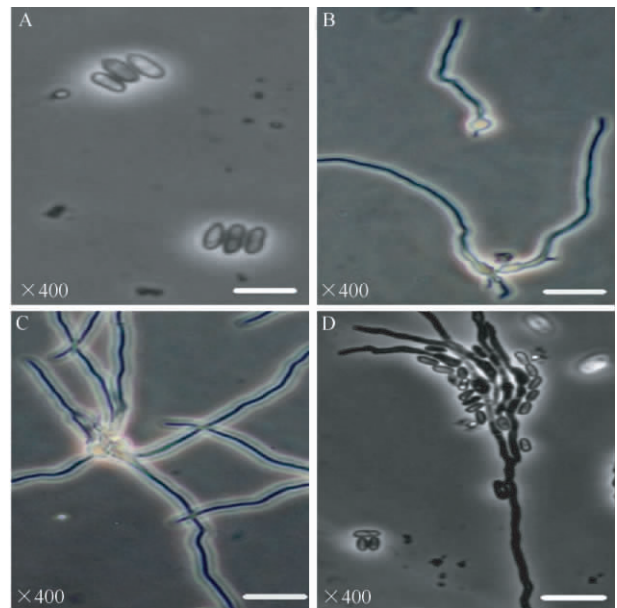
图 1. 粘帚菌 6.102 的生长和形态分化 (400 \times)

Figure 1. The growth and morphological differentiation of *Gliocladium* sp. 6.102 (A), Conidial spores of *Gliocladium* sp. (B), Germination of conidial spores after 6 h in the TSA medium (C), Extension and differentiation of the fungal mycelia in TSA medium (D), Sporulation after 72 h in TSA medium. Each scale bar represents 5 mm (400 \times).

2.2 农杆菌介导的粘帚菌遗传转化 (ATMT)

TSA、PDA 和含有 3% 二甲基亚砜 (DMSO) 的 PDA 培养基被用来做检测粘帚菌对博莱霉素、G418、草胺磷和潮霉素 B 的敏感性, 其中潮霉素 B 的使用

浓度范围由 50 到 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、博莱霉素的使用浓度范围由 10 到 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、G418 和草胺磷的使用浓度范围由 100 到 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 3)。检测表明, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的潮霉素 B 在 TSA 培养基上或 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的潮霉素 B 在 PDA 培养基上可以有效抑制粘帚菌的生长, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 G418 在含有 3% DMSO 的 PDA 培养基上可以有效抑制菌体的生长。其它抗生素或其他条件都不能有效抑制粘帚菌的生长。因此潮霉素 B 被选择用来筛选粘帚菌的转化子。

表 3. 粘帚菌对不同抗生素的敏感性实验

Table 3. Sensitivity of *Gliocladium* sp. 6. 102 to different antibiotics

Selective agent	Medium	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
		tested	working
Hygromycin B	TSA	50 - 400	200
Hygromycin B	PDA	50 - 400	300
Bleomycin	TSA	10 - 80	-
Bleomycin	PDA	10 - 80	-
Bleomycin	PDA + 3% DMSO	10 - 80	-
Geneticin	TSA	100 - 800	-
Geneticin	PDA	100 - 800	-
Geneticin	PDA + 3% DMSO	100 - 800	500
Glufosinate	TSA	100 - 800	-
Glufosinate	PDA	100 - 800	-
Glufosinate	PDA + 3% DMSO	100 - 800	-

含有潮霉素 B 磷酸转移酶基因 (*hph*) 的 pAg1-H₃ 质粒用于农杆菌介导的粘帚菌遗传转化实验。尽管含有 pAg1-H₃ 质粒的转化子在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 - 5 d 即可长出单菌落, 但是转化的效率非常低。为了

提高转化效率, 我们通过正交试验来检测影响转化效率的因素: 共培养的时间、农杆菌的体积、乙酰丁香酮的浓度和 pH 值。表 4 的极差结果显示在影响转化效率的因素中, 最后 4 行的结果表示的是转化子的个数, 3 个平均值分别是每个因素中 3 个水平所得到的转化子的个数计算得到的, 极差表示的是均值的最大值和最小值的差距。根据以上结果, 其影响因素的主次依次为: 农杆菌的体积、共培养的时间、pH 值和乙酰丁香酮的浓度。同时由表 4 的均值可以看出最适的培养条件是: 400 μL 农杆菌 ($OD_{600} = 0.6$) 与 100 μL 粘帚菌孢子悬液混合 (1×10^7 孢子/ mL)、共培养的时间为 3 d、pH 值为 5.3 - 5.8 和乙酰丁香酮的浓度为 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。最终我们得到的转化效率为 50 - 100 转化子/ 10^6 孢子。

2.3 转化体系验证

为了验证转化体系的稳定性, 我们将 *egfp* 基因和 *trpC* 启动子连接到质粒 pBHt2 上得到质粒 pBTG (图 2-A)。通过 ATMT 的最适条件将质粒 pBTG 转入粘帚菌 6. 102 中, 得到约 200 个转化子。随机选取 10 个转化子用 *hph* 的引物进行 PCR 验证 (图 2-B)。在验证的转化子中随机选取一个进行 Western blot 实验, 阳性信号带表明 *egfp* 基因已经成功的在粘帚菌菌体中表达 (图 3-A), 用荧光显微镜也观察到了绿色荧光 (图 3-B)。以上实验证明了该遗传转化体系能够在粘帚菌中有效使用, 同时绿色荧光蛋白也可以作为粘帚菌的一个报告基因。

表 4. 正交试验结果

Table 4. Results of orthogonal design experiments

Numbers	Factors					Transformation efficiency#
	Co-cultivation period/d	<i>A. tumefaciens</i> volume/ μL	<i>c</i> (Acetosyringone) / ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	pH		
One	2	200	200	5.0	1.2	
Two	2	400	400	5.3	27.1	
Three	2	800	800	5.8	6.8	
Four	2.5	200	400	5.8	9.5	
Five	2.5	400	800	5.0	15.7	
Six	2.5	800	200	5.3	15	
Seven	3	200	800	5.3	25.3	
Eight	3	400	400	5.8	52.1	
Nine	3	800	200	5.0	6.7	
Average 1	11.700	12.000	22.767	7.867		
Average 2	13.400	31.633	14.433	22.47		
Average 3	28.033	9.500	15.933	22.80		
Range	16.333	22.133	8.334	14.933		

Transformants per 10^6 fungal conidia.

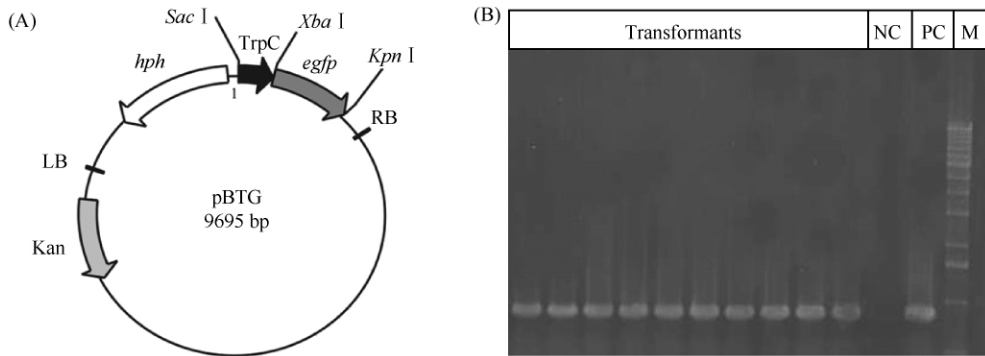


图 2. 质粒 pBTG 的构建和转化子的 PCR 验证

Figure 2. Construction of the plasmid pBTG and identification of the transformants by PCR. A, The entire *egfp* gene with the TrpC promoter was inserted into the *SacI/KpnI* site of the vector pBH2; B, The transformants were identified by amplification of the *hph* gene (859 bp) with primers HphF and HphR. Transformants: the identified transformants; NC, negative control; PC, positive control; M, 1 kb ladder.

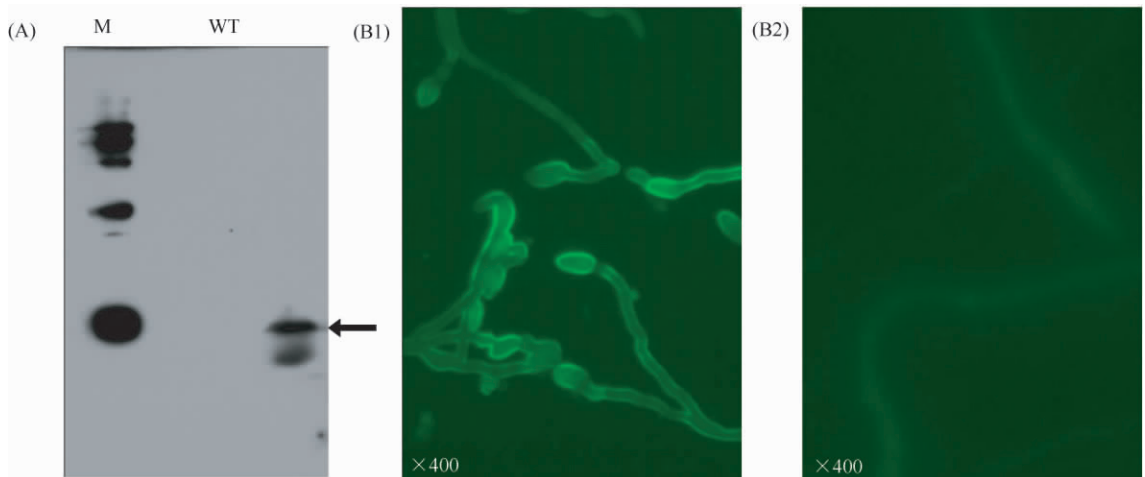


图 3. Western blot 和荧光显微检测绿色荧光蛋白的表达

Figure 3. Western blot analysis using the anti-EGFP antibody and fluorescence microscopy observation of putative transformant mycelia. A, Western blot. M: EasySee Western Marker; WT: wild type strain; T: the identified transformants (26.9 kDa); B1, the mycelia of transformants under the fluorescence microscopy; B2, the mycelia of wild type under the fluorescence microscopy.

3 讨论

粘帚菌 6.102 能够产生不同种类的次级代谢物^[1],但是这些次级代谢物(如 verticillins 等)的生物合成途径不清楚,其产量也非常低,这对化合物的应用带来很大的不便。遗传操作是研究次级代谢物生物合成途径和提高其产量的常用技术^[11]。由于粘帚菌没有合适的遗传操作方法,所以我们需要建立该菌的一套遗传操作技术。我们曾经试图建立粘帚菌的原生质体的转化方法,但是很难获得大量的完整的粘帚菌原生质体。因此我们选择了 ATMT 的

方法,并且也在该菌中成功构建了粘帚菌的 ATMT 操作体系,为研究其次级代谢物的生物合成和调控提供了技术手段,同时也是第一次报道粘帚菌的遗传操作体系。

同其它真菌一样,粘帚菌的转化效率受很多因素的影响。在转化中最合适的共培养的温度是 22℃ - 26℃,原因可能是 *vir* 基因的表达和 T-DNA 的整合的最适温度是 22℃ - 26℃^[12],我们选择了 24℃ 作为共培养的温度。农杆菌的生长状态也影响转化的效率。对数期的农杆菌的转化效率最高,可能是因为对数期的农杆菌具有很强的活力和状态,容易同真菌发生接合转移^[12]。为了提高转化的

效率,我们可以适当的增加农杆菌或真菌孢子的浓度,但是农杆菌和真菌孢子的比例要合适,农杆菌的数量太多或太少都会影响转化的效率^[6, 13]。共培养的时间也是一个重要的影响因素。时间太短会降低转化效率,时间太长会导致真菌的过度生长和产生非单一的插入位点从而会增加假阳性的概率^[8, 12]。合适的 pH 值是 5.3 – 5.8, 因为这个 pH 值可以使真菌和细菌同时生长,不会出现一种菌生长过盛而抑制另一种菌生长的现象^[8]。另外,乙酰丁香酮在共培养时也是必需的,但是高浓度的乙酰丁香酮由于存在细胞毒性也可以降低转化的效率^[12]。

由于粘帚菌在 TSA 和 PDA 培养基上对 G418、草胺磷和博莱霉素等都不敏感,因此我们向培养基中加入 DMSO,原因是 DMSO 可以增加细胞膜的通透性,从而提高对药物的敏感性^[14]。我们的结果显示在 PDA 培养基中加入合适浓度的 DMSO (3%) 提高了粘帚菌对 G418 的敏感性。很多真菌对抗生素的不敏感阻碍了真菌的遗传操作^[15]。在培养基中加入合适的 DMSO 可以增加菌体对一些抗生素的敏感性,从而可以增加遗传选择标记,为遗传操作带来便利。

参考文献

- [1] Guo H, Hu H, Liu S, Liu X, Zhou Y, Che Y. Bioactive p-terphenyl derivatives from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Gliocladium* sp.. *Journal of Natural Products*, 2007, 70 (9) :1519-15121.
- [2] Chen Y, Guo H, Du Z, Liu XZ, Che Y, Ye X. Ecology-based screen identifies new metabolites from a *Cordyceps*-colonizing fungus as cancer cell proliferation inhibitors and apoptosis inducers. *Cell Proliferation*, 2009, 42 (6) : 838-8347.
- [3] Che YS. Discovery of new bioactive natural products from fungi of unique ecological niches. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2011, 38 (1) :12-27.
- [4] Zhang YX, Chen Y, Guo XN, Zhang XW, Zhao WM, Zhong L, Zhou J, Xi Y, Lin LP, Ding J. 11'-dideoxy-verticillin: a natural compound possessing growth factor receptor tyrosine kinase-inhibitory effect with anti-tumor activity. *Anti-cancer Drugs*, 2005, 16 (5) :515-524.
- [5] Zhang N, Chen Y, Jiang R, Li E, Chen X, Xi Z, Guo Y, Liu X, Zhou Y, Che Y, Jiang X. PARP and RIP 1 are required for autophagy induced by 11'-deoxyverticillin A, which precedes caspase-dependent apoptosis. *Autophagy*, 2011, 7 (6) :598-612.
- [6] Michiels CB, Hooykaas PJ, van den Hondel CA, Ram AF. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*, 2005, 48 (1) :1-17.
- [7] Casas-Flores S, Rosales-Saavedra T, Herrera-Estrella A. Three decades of fungal transformation: novel technologies. *Methods Molecular Biology*, 2004, 267: 315-325.
- [8] Zheng Z, Huang C, Cao L, Xie C, Han R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Fungal Biology*, 2011, 115 (3) : 265-274.
- [9] Liu L, Long LK, An Y, Yang J, Xu X, Hu CH, Liu G. The thioredoxin reductase-encoding gene *ActrXR1* is involved in the cephalosporin C production of *Acremonium chrysogenum* in methionine-supplemented medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97 (6) : 2551-2562.
- [10] Yang J, Xu X, Liu G. Amplification of an MFS transporter encoding gene *penT* significantly stimulates penicillin production and enhances the sensitivity of *Penicillium chrysogenum* to phenylacetic acid. *Journal of Genetics and Genomics*, 2012, 39 (11) :593-602.
- [11] Hopwood DA. Antibiotics: opportunities for genetic manipulation. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B. *Biological Sciences*, 1989, 324 (1224) :549-562.
- [12] Zhang P, Liu TT, Zhou PP, Li ST, Yu LJ. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of a taxol-producing endophytic fungus, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current Microbiology*, 2011, 62 (4) :1315-1320.
- [13] Zhang P, Xu B, Wang Y, Li Y, Qian Z, Tang S, Huan S, Ren S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the fungus *Penicillium marneffei*. *Mycological Research*, 2008, 112 (Pt 8) :943-949.
- [14] Notman R, Noro M, O'Malley B, Anwar J. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128 (43) :13982-13983.
- [15] Zhang S, Fan Y, Xia YX, Keyhani NO. Sulfonylurea

resistance as a new selectable marker for the
entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied*

Microbiology and Biotechnology, 2010, 87 (3): 1151–
1156.

Genetic transformation of the fungus *Gliocladium* sp. mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

Yanling Wang¹, Pengjie Hu¹, Erwei Li¹, Xingzhong Liu¹, Yongsheng Che²,
Gang Liu^{1*}

¹State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

²Beijing Institute of Pharmacology & Toxicology, Beijing 100850, China

Abstract: [Objective] To construct a transformation system in *Gliocladium* sp. 6.102, a *Cordyceps*-colonizing fungus producing a variety of epipolythiodioxopiperazine (ETP) compounds with drug potentials. [Methods] *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) was used to transform *Gliocladium* sp. 6.102. The factors of bacterial cell concentration, co-cultivation time, pH and acetosyringone concentration were optimized. [Results] A total of 50 – 100 transformants per 10⁶ fungal conidia was obtained via the optimal ATMT method. The genes encoding hygromycin B phosphotase and enhanced green fluorescent protein (EGFP) were transferred into *Gliocladium* sp. by the optimal ATMT method. The marker genes were successfully expressed and stably maintained in the transgenic fungus. [Conclusion] A transformation system was established for *Gliocladium* sp. 6.102 and this system may be useful to identify ETP biosynthetic genes in *Gliocladium*.

Keywords: *Gliocladium* sp., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, green fluorescent protein

(本文责编:王晋芳)