

# 促进真菌染色体重组的 MCB<sup>L</sup> 共诱导平板的构建和应用

艾云灿 孟繁梅

(中山大学生命科学院 广州 510275)

**摘要** 基于对樟脑(Camphor)和苯菌灵(Benomyl)可能分别诱导细胞核膜融合和染色体不分离性重组的机理认识,设计了 MCB<sup>L</sup> 共诱导平板,以察氏(Czapek)培养基含有 1% Camphor 及 0.5 $\mu$ g/ml Benomyl 为基础制作平板。以属间融合组合 *Aspergillus niger*  $\times$  *Trichoderma reesei* 为例,研究所设计的几种诱导平板处理方法对融合子代群体的基因型和表型变异的影响,结果表明常规分步诱导处理,杂合二倍体阶段缺乏或极短暂难以获得重组单倍体;而经过 MCB<sup>L</sup> 共诱导平板处理能够获得类型齐全的分离子,显著提高表现二倍化率和染色体不分离性重组单倍体的比率。显示 MCB<sup>L</sup> 共诱导平板能够有效地扩增捕捉到极短暂杂合二倍体的机率,促进不稳定异核体向重组单倍体的转化,扩增染色体不分离性重组频率。再生菌丝菌龄对共诱导效果影响显著。由此对共诱导机制和应用前景提出讨论。

**关键词** 染色体重组,共诱导, camphor, benomyl, *Asperigillus niger*, *Trichoderma reesei*

学科分类号 Q789.

丝状真菌纤维素酶系基因组的众多结构基因位于不同染色体上<sup>[1]</sup>,细胞融合方法被认为是转移基因组构建远缘杂种优势菌群的理想途径。但在以 *Aspergillus niger*  $\times$  *Trichoderma reesei* (viride)为代表的属间融合组合中遇到许多困难,如融合频率低、异核体不稳定、重组单倍体获得及鉴定困难等<sup>[2,3]</sup>。前文已分别报道了“营养缺陷库”作为选择标记扩增远缘融合频率<sup>[4]</sup>;计算机辅助的酶系组分协同作用模型判定基因组融合重组发生<sup>[5]</sup>,及 R-Q 对应因子分析法识别分群重组子代<sup>[6]</sup>;重组子杂种优势动力学分析<sup>[7]</sup>;群体杂种优势分子基础及其遗传表达相容性和稳定性评估<sup>[8]</sup>等方法。本文继续报道旨在促进不稳定异核体直接向重组单倍体转化的 MCB<sup>L</sup> 共诱导平板以察氏(Czapek)培养基含有樟脑(Camphor, 0.1%)和低浓度苯菌灵(Benomyl, 0.5 $\mu$ g/ml)的设计制作和应用。

## 1 材料方法

### 1.1 菌株

*A. niger* AMS11 和 *T. reesei* QM9414 来源及特征见文献[4]。

### 1.2 培养基

以察氏(Czapek)培养基<sup>[10]</sup>作为基本培养基(MM),含 0.6mol/L 蔗糖和 1.0% 琼脂糖

国家自然科学基金、中国博士后科学基金、国际科学基金(IFS)和广东省自然科学基金资助。

本文部分内容曾在“8th European Conference of Biotechnology (Hungary, 1997)”上报告。

收稿日期:1997-08-05,修回日期:1998-01-14。

的 MM 用作融合原生质体再生的高渗基本培养基(HMM)。以含有诱导剂的 MM(参见表 1)作为对再生菌丝体倍性处理的诱导培养基。

### 1.3 原生质体融合操作

按文献[9]制备双亲株 *A. niger* AMS11 和 *T. reesei* QM9414 的原生质体,再按文献[4]进行双亲株原生质体紫外线灭活和 PEG 介导融合。融合原生质体置 HMM 再生平板上,28℃ 暗室培养(防止光修复)至出现再生菌落。

### 1.4 再生菌丝倍性诱导处理

从 HMM 平板上取融合再生菌丝顶端(或微菌落琼脂块)移接到诱导平板上(参见表 1),置 28℃ 培养 7d 至产生分生孢子。记录菌落表型变化特征。所采用 (+)-Camphor 和 Benomyl 分别作为二倍化<sup>[3]</sup>和单倍体诱导剂<sup>[2,10]</sup>,购自 Sigma 和 DuPont 公司。

表 1 3 种典型的倍性诱导处理方式

Table 1 Three types of ploidity induction

Type	Comment	Medium composition
A. Longer cultivation in situ and auto-segregation	Transferred the regenerated mycelium HMM onto MC plates to be induced for a week till the sectors of heterodiploid conidia formed	MM+0.6mol/L sucrose(HMM)
B. Step-by-step induced segregation	Transferred the sector conidia from MC onto MB plates to germinate and be induced for another week till new sectors of conidia of recombinant haploids formed	MM + Camphor(MC) MM + Benomyl(MB)
C. Co-induced Segregation	Transferred the tips of regenerated onto MCB <sup>-</sup> (L) plates and induced for a week till conidiation	MM + Camphor + Benomyl (MCB <sup>-</sup> )

### 1.5 分离子倍性判别归类和分子鉴定

按文献[2,4]对诱导平板上的分离子菌落表型及分生孢子特征进行鉴定,包括测定孢子直径、核相、DNA 含量,孢子分离测验(Benomyl-test)<sup>[10]</sup>,孢子表面形态扫描电镜观察等。综合从融合再生时起至产孢子后的菌落表型特征和孢子倍性分析结果,参照文献中标准准性生殖循环各阶段特征<sup>[10]</sup>,判别归类分离子的表型和基因型。采用我们建立的 DNA 指纹和纤维素酶系同工酶多态性分析方法<sup>[8,11]</sup>鉴定典型分离子。

## 2 结果分析

### 2.1 诱导平板设计和倍性处理

**2.1.1 设计依据:**从文献报道种内和种间隔合组合的绝大多数结果来看,都具有从稳定异核体经杂合二倍体至重组单倍体等典型阶段,属于标准式的准性生殖循环类型<sup>[10]</sup>,常常可以采用分步诱导法对再生菌丝体进行倍性诱导处理,即(A)经 HMM 平板上延时培养自发分离或(B)先经含有樟脑的 MM 平板诱导再生菌丝体分离,促使其从异核体迅速形成杂合二倍体的分生孢子(通常形成菌落上的扇形角变孢子区域),然后选取该角变孢子移接到含有苯菌灵的 MM 平板上萌发,进一步诱导产生新的角变孢子,形成单倍体的重组分离子<sup>[13,14]</sup>。但是实验表明以 *A. niger* × *T. reesei* 为代表的属间融合,由于异核体

极不稳定,杂合二倍体状态缺乏或极短暂<sup>[2-4]</sup>,难以按常规“二步法”诱导,为此我们设计了复合式共诱导处理(C)(表1)。

**2.1.2 诱导剂的浓度选择试验:**文献报道种内和种间融合组合的情形;常采用0.1%樟脑(W/V)和1.5 $\mu\text{g/g}$ 苯菌灵分别作为二倍化和单倍化诱导<sup>[13,14]</sup>。也有文献报道利用高浓度苯菌灵作“杀真菌剂”<sup>[12]</sup>,而中等浓度则用作“Benomyl-test”测定野生菌丝的倍性和基因型纯度<sup>[10]</sup>,这些“高、低、中”浓度的绝对值随不同真菌属种而差异较大。预备试验结果表明,对*A. niger* × *T. reesei*而言,0.1%~1.0%樟脑浓度范围对倍性诱导效果影响不大,而苯菌灵三段效应的浓度值( $\mu\text{g/ml}$ )分别为(低浓度)0.5~1.0、(中浓度)2.0~4.0、(高浓度)>10.0。从减少对细胞毒性考虑,这里分别选用0.1%樟脑和0.5 $\mu\text{g/g}$ 苯菌灵(低浓度)用于制作各种诱导平板。

**2.1.3 制作诱导平板的操作和注意事项:**正确操作是配制表1所列各种诱导平板的关键。实验研究表明,苯菌灵为水溶性,可先配制成30%(W/V)的水溶液,再加入MM培养基中使其终浓度为0.5 $\mu\text{g/g}$ ,湿热灭菌后用于制作MB单倍化诱导平板。湿热灭菌的过程有利于形成活性成分MBC<sup>[12]</sup>。樟脑则不溶于水,应先配成10%(W/V)乙醇溶液,经过0.2 $\mu\text{m}$ 细菌过滤器除菌,小心倒入冷却后的无菌液态MM培养基中,使终浓度达到0.1%。然后轻摇混匀后即可用于制作MC二倍化诱导平板。当配制MCB<sup>L</sup>(即MM 0.1% Camphor 0.5 × 10<sup>-6</sup> Benomyl)平板时,应按上述方法先分别配制含0.5 × 10<sup>-6</sup>  $\mu\text{g/g}$ 苯菌灵的无菌MB和无菌的10%樟脑-乙醇溶液,然后小心混合使其终浓度分别达到0.5 × 10<sup>-6</sup>  $\mu\text{g/g}$ 苯菌灵和0.1%樟脑,轻轻摇匀后制作平板。凝固后用锡箔纸包好置4℃冷藏备用,不宜久藏。

## 2.2 在不同诱导平板上分离子的表型和基因型变异

不同处理和实验结果见表2。

表2 *A. niger* × *T. reesei* 融合再生的菌丝体在不同诱导平板上的分离于类型

Table 2 Variations of segregates from the regenerated mycelium of fusant of *A. niger* × *T. reesei* on different inducing-plates

Treatment			The ratios of genotype/%						
Inducing plate	Age	AD <sub>i</sub> * %	Heterokaryon	Nondisjunctional		Recombinant	Heterodiploid	Aneuploid	
				<i>A. niger</i> -like		Sector			
A.	HMM	in situ	5.4	94.6	5.4	0	0	0	
B.	①MC	4d	7.3	94.6	5.4	0	0	0	
		2d	7.3	92.7	7.3	0	0	0	
		36h	91.1	8.9**	0.0	0	0	0	
C.	②MB	-	8.9	99.9	<0.1	0	0	0	
		MCB <sup>L</sup>	4d	16.7	83.3	16.1	0.6	0	0
			2d	55.9	44.1	40.9	14.0	0.3	0.7
			36h	83.6	16.4	34.0	41.0	0.7	7.9
24h	13.4		77.8	13.4	1.2	0.9	6.7		

\* AD: Apparent diploidization ratio = 100 heterokaryon%

\*\* Conidia of *A. niger*-like for MC were further used for segregation-inducign on MB (see in Table 1).

表 2 展示出 *A. niger* × *T. reesei* 子代群体中分离变异类型和频率随不同诱导处理方式的差异十分显著。采用自发分离(A)和分步诱导(B)时,所得结果分别与 Kirimura 等和 Tahoun 等报道一致,只能获得大量不稳定的异核体和极少量单亲型表型(*A. niger-like*)的单倍体<sup>[2]</sup>,或极少量的不稳定杂合二倍体<sup>[3]</sup>。只有在 MCB<sup>L</sup> 共诱导平板(C)上才能获得我们已报道的 4 大类型齐全的分离子,其中 60% 以上为重组单倍体,它们包括来自于单亲表型(*A. niger-like*)和扇形角变两种类型菌落表型的情形,从中都能够筛选出具有纤维素酶系显著杂种优势的重组子<sup>[4~7]</sup>。分子鉴定结果<sup>[8,11]</sup>表明这些优秀重组单倍体表现出很强的“染色体不分离性重组”特征<sup>[10]</sup>,即同一连锁群(染色体)上的基因总是一起分离,表现为某些相关表型的分离类型较稳定,再现频率极高<sup>[4,6,8,11]</sup>。这些结果共同表明 MCB<sup>L</sup> 共诱导平板能够有效地扩增捕捉到极短暂杂合二倍体的几率,显著提高表观二倍化率(AD, 异核体率的余集),促进不稳定异核体向重组单倍体转化,从而扩增重组频率。

### 2.3 再生菌丝菌龄影响 MCB<sup>L</sup> 平板的共诱导效果

从表 2 还看出,融合再生菌丝的菌龄影响 MCB<sup>L</sup> 平板的共诱导效果。对于 *A. niger* × *T. reesei* 而言,挑取 HMM 平板上刚刚融合再生的微型菌落(直径约 2mm,再生培养时间约为 36h)移接到 MCB<sup>L</sup> 平板上时,诱导转化效果最佳,不仅分离子类型齐全,而且重组单倍体比例多。过迟地将再生菌丝体转向倍性诱导处理效果不佳,过早则会影响融合子再生,结果说明权衡选择再生完全和及时转入倍性诱导的“时间临界点”十分必要。

## 3 讨 论

Caten<sup>[10]</sup>总结自发的真菌准性生殖过程,归纳出标准式循环包括异核体、杂合二倍体、重组单倍体和非整倍体四大阶段,其中形成重组单倍体的分子机制包括“染色体同源交换性重组”和“染色体不分离性重组”两种情形。早期研究发现用樟脑熏蒸可以增加核杂合二倍化频率,并证实是直接诱导作用而不是次级选择效应<sup>[10]</sup>。但迄今分子机制不明确,研究者认为其强疏水性结构特点,能够促进异核体中核膜融合<sup>[4,10]</sup>。苯菌灵是杀真菌剂,作用机制已清楚。通过抗性突变分子遗传学研究,反向阐明了其活性成分 MBC 是微管单体的特异性高亲和力配体,能够强烈抑制微管蛋白组装成纺锤体而干扰有丝分裂过程,诱导染色体不分离行为。高浓度 MBC 容易造成大量非整倍体,引起遗传生理学系列紊乱而杀死真菌<sup>[12]</sup>。选择适当浓度可以用作人工单倍化诱导剂<sup>[10,12]</sup>。

原生质体融合后杂种细胞中染色体的分离过程遵循准性生殖循环规律。国外学者分别采用樟脑和苯菌灵进行分步诱导杂合二倍化和重组单倍化,并且在属以下融合组合中多有成功报道<sup>[13,14]</sup>。然而实验表明 *A. niger* × *T. reesei* 属间融合是非标准式的,杂合二倍体状态极短暂,难以实现界限分明的由异核体经杂合二倍体至重组单倍体的分步转化过程<sup>[2~4]</sup>。本研究设计构建了 MCB<sup>L</sup> 共诱导平板,是基于对樟脑和苯菌灵作用机制的认识<sup>[10,12]</sup>,即两种诱导剂作用靶位点不同,前者在核膜后者在微管,分别作用于核膜融合和核分裂两个时空上异步的阶段。通过改良为复合式共诱导处理(表 1),使得异核体一旦经诱导核膜融合形成极短暂的杂合二倍核,进入有丝分裂即被诱导加速单倍重组化,由此有效地扩增了捕捉到极短暂杂合二倍体并向重组单倍体转化的机率。表 2 结果表示再生

菌丝体及早接受共诱导处理能产生表型和基因型广泛变异,也是实验佐证。这里指出,MCBL 共诱导平板处理还可能应用到研究远缘物种或隔离型细胞杂种中染色体分离的行为规律、染色体重组和缺失实验等。

### 参 考 文 献

- 1 Carter G L, Allison D, Michael W R *et al.* Mol Microbiol, 1992, 6(15):2167~2174
- 2 Kirimura K, Itchiya Y. Agric Biol Chem, 1990, 54(5):1281~1283
- 3 Tahoun M K, Ibrahim A A. Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Program and Abstracts, Poster 94, Colorado, USA, May 7~11, 1995.
- 4 艾云灿,孟繁梅.见:湖北科学技术委员会编,中国科协首届青年学术年会(湖北)优秀论文集,武汉:武汉大学出版社,1994, pp. 295~301
- 5 Ai Y C, Zhao X H, Yu J L. Chin J Biotechnol, 1994, 10(1):61~66
- 6 Ai Y C, Meng F M, Gao P J *et al.* Chin J Biotechnol, 1996, 12(1):28~33
- 7 Ai Y C, Meng F M, Xu Y C. Chin J Biotechnol, 1997, 13(3):241~245
- 8 艾云灿,藤如君,高培基等.微生物学报,1998, 38(3):186~192
- 9 艾云灿,赵学慧,汪履绥.华中农业大学学报,1993, 12(4), 376~381
- 10 Caten C E. In: Gull K eds, Fungal Nucleus, London: Cambridge University Press, 1981, pp. 191~214
- 11 Ai Y C, Meng F M, Luo J X *et al.* In: 8th European Conference of Biotechnology, Abstract Book, Budapest, Hungary, 1997, August 17~21
- 12 Oakley B R. In: Timberlak W E ed, Molecular Genetics of Filamentous Fungi, New York: Alan R. Liss Inc., 1985, pp. 225~238
- 13 Hoh Y K, Tan T K, Yeoh H H. Appl Biochem Biotechnol, 1992, 37(1), 81~88
- 14 Sandahu D K. Appl Biochem Biotechnol, 1992, 33/34, 175~183

## Construction and Application of MCB<sup>L</sup> Plate for Facilitation of Chromosome Recombination in Fungi

Ai Yuncan Meng Fanmei

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

**Abstract** A MCB<sup>L</sup> plate was designed and constructed based on the proposed mechanism that camphor could induce the nuclear membrane fusion while benomyl induce the nondisjunctional recombination of chromosome in fungi. This so-called co-induction plate consisted of 0.1% camphor (W/V) and  $0.5 \times 10^{-6}$  benomyl contained in Czapek's minimal medium. The construction procedure with cautions of this plate was developed in details. One typical example of intergeneric fusion-cross, *Aspergillus niger* × *Trichoderma reesei*, was investigated, comparing the ratios of genotype and phenotype of fusant progeny caused by the co-induction of MCB<sup>L</sup> plate and by the step-by-step induction with camphor and benomyl respectively. The results showed that the heterodiploid state was extremely transient and the recombinant haploid was scarcely obtained when induced by the routine step-by-step method, whereas the ratios of apparent diploidization and nondisjunctional recombinant haploidization among all types of varied segregants on MCB<sup>L</sup> plate were greatly improved compared with those on the routine plates containing single reagent, which indicated that the transient heterodiploid could be grasped and transformed further into nondisjunctional recombinant haploid when co-induced by MCB<sup>L</sup> plate. The age of regenerated mycelium to be induced was observed to affect dominantly on the co-induction effects of MCB<sup>L</sup> plate. The mechanism of co-induction of MCB<sup>L</sup> plate and its perspective applications were also discussed.

**Key words** Chromosome recombination, co-induction, camphor, benomyl, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*