

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150054

提高根癌农杆菌介导黑曲霉转化效率的研究

曹张磊, 王德培, 张 岚

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 为提高根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导黑曲霉(*Aspergillus niger*)转化(ATMT)效率, 本文对影响转化效率的分生孢子与农杆菌的比例、转化媒介、诱导溶氧、诱导时间、诱导时乙酰丁香酮(AS)浓度这5个因素进行单因素实验, 最终确定提高其转化效率的最优条件为: 根癌农杆菌诱导过程在400 μmol/L乙酰丁香酮终浓度条件下, 100 mL三角瓶中28℃、100 r/min振荡培养5 h, 分生孢子与根癌农杆菌的比例为1:100, 在硝酸纤维素膜媒介上24℃共培养48 h。在此优化条件下, 黑曲霉的转化效率达到35个/10⁷分生孢子。相比于优化前, 转化效率提升了78%, 并且整合至黑曲霉基因组的外源潮霉素B抗性基因在转接15代以后仍能稳定遗传。

关键词: 黑曲霉; 根癌农杆菌; 潮霉素B抗性

中图分类号: Q933

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2016)02-0020-06

Improvement of Transformation Efficiency of *Aspergillus niger* Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

CAO Zhanglei, WANG Depei, ZHANG Lan

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: To improve the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) efficiency of *Aspergillus niger*, we performed some single-factor tests for five factors: ratio of conidia to bacterium, transformation media, inducing dissolved oxygen, inducing time and inducing concentration of acetosyringone (AS). The optimum conditions to improve the transformation efficiency were as follows: *A. tumefaciens* was cultivated in 400 μmol/L AS at 28℃ and 100 r/min for 5 h in 100 mL conical flask; co-cultivation was conducted at a 1:100 ratio of conidia to bacterium on nitrocellulose membrane at 24℃ for 48 h. Under the above optimized conditions, the transformation efficiency of *A. niger* achieved 35 transformants/10⁷ conidia. The transformation efficiency was increased by 78% compared with that before optimization, and all the selected hygromycin B resistant transformants were genetically stable after 15 subcultures on complete medium.

Key words: *Aspergillus niger*; *Agrobacterium tumefaciens*; hygromycin B resistance

黑曲霉(*Aspergillus niger*)现已成为重要的工业发酵菌种之一, 广泛应用于食品加工、轻化纺织、饲料加工、废物处理、医药等领域。工业生产菌株黑曲霉(*Aspergillus niger*) CBS 513.88全基因组测序的完成为在分子层面上研究黑曲霉代谢机理、提升菌株性能奠定了理论基础^[1]。根癌农杆菌介导转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)方法的建立, 大大简化了丝状真菌的转化操

作, 提高了其转化效率, 为丝状真菌基因功能的研究、有用基因的克隆表达与菌株遗传性能的改造开辟了一条全新途径。

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)是一种能够侵染植物体受伤的组织细胞的革兰氏阴性菌, 最初应用于植物细胞的基因转化研究, 其能在自然状态下对受伤的植物细胞所释放的各种酚类物质产生趋向性, 侵染植物伤口进入细胞后, 将T-DNA^[2]转入植

收稿日期: 2015-04-27; 修回日期: 2015-08-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31471725)

作者简介: 曹张磊(1990—), 男, 浙江人, 硕士研究生; 通信作者: 王德培, 教授, shiyao218@163.com.

物细胞内并整合至植物的基因组中,最终导致植物肿瘤的产生,广泛应用于农业生产中植物体的遗传改造. De Groot 等^[3]利用根癌农杆菌转化了黑曲霉,这为丝状真菌的遗传转化提供了新的研究方法. 根癌农杆菌介导黑曲霉转化效率受到诸多因素的影响,如何提高其在黑曲霉中的转化效率仍是一个值得研究的课题. 黎明等^[4]发现孢子悬液的新鲜程度和浓度、农杆菌菌液浓度、共培养时间、共培养温度这 5 个主要因素对农杆菌介导黑曲霉的转化效率产生较大影响. 郭慧等^[5]发现乙酰丁香酮加入与否对日本曲霉转化效率有着明显的影响,进一步验证了诱导物的添加能活化农杆菌中的毒性蛋白,提高侵染效率. 龙朝钦等^[6]对根癌农杆菌介导的烟曲霉转化条件进行优化时发现,转化媒介对根癌农杆菌介导烟曲霉转化效率影响显著. 本文曾参考黎明等^[4]和 Michielse 等^[7]的实验方法所得到的转化子平均个数为 15 个/ 10^7 分生孢子,转化效率低,推测其原因是农杆菌的侵染毒性低. 通过查阅文献,发现很少有学者关注诱导农杆菌过程各因素对转化效率的影响,因此本文就提高农杆菌侵染毒性即农杆菌在诱导过程中溶氧条件、诱导时间、诱导物乙酰丁香酮浓度以及其他相关提高转化效率的因素进行了研究,为进一步完善根癌农杆菌介导的黑曲霉遗传转化体系奠定基础.

1 材料与方 法

1.1 菌株、质粒与培养基

黑曲霉(*Aspergillus niger*) CGMCC 5751、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) AGL1、质粒 p50 均为本实验室保存.

LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,氯化钠 10 g,蒸馏水定容至 1 L,固体培养基中加入琼脂粉 15 g,121 °C 灭菌 20 min.

PDA 固体培养基:称取去皮马铃薯 200 g,切成小块,加入适量蒸馏水,煮沸 30 min,6 层纱布过滤,定容至 1 L,加入葡萄糖 20 g,琼脂粉 20 g,121 °C 灭菌 20 min.

IM 诱导培养基、CM 培养基、农杆菌侵染所需培养基及试剂参考文献^[7]配制.

1.2 试剂与溶液的配制

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶等, TaKaRa 公司;乙酰丁香酮(AS), Sigma 公司;质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、潮霉素

B, Solarbio 公司;2-(N-吗啉代)乙烷磺酸钠盐(MES),上海生工生物工程有限公司;其他试剂,天津市北方天医化学试剂厂.

基因组提取缓冲液:5 mol/L NaCl 20 mL, 0.5 mol/L EDTA 100 mL, 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.5) 50 mL, 10% SDS 100 mL,蒸馏水定容至 1 L.

TE 缓冲液:1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0) 10 mL, 0.25 mol/L EDTA(pH 8.0) 4 mL,蒸馏水定容至 1 L.

pH 5.0 HAc-NaAc 溶液:称取 NaAc 5.4 g,溶于适量去离子水中,用醋酸调节 pH 至 5.0,定容至 100 mL.

苯酚混合物:苯酚、三氯甲烷、异戊醇按体积比 24 : 25 : 1 量取混合.

1.3 黑曲霉分生孢子的制备

取 6 mL 灭菌蒸馏水,从培养 4 d 的黑曲霉 PDA 平板上洗孢子,用无菌水稀释孢子悬液,血球计数板计数至孢子密度为 2×10^7 mL⁻¹ 备用.

1.4 根癌农杆菌 AGL1 感受态细胞的制备

挑取根癌农杆菌 AGL1 接种于 3 mL LB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 培养过夜;取 2 mL 培养液于 100 mL LB 液体培养基中继续培养,至 A_{600} 为 0.5 左右;将培养液置冰浴中 40 min,4 °C、5 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液;4 °C、10 mL 的无菌水离心洗涤 1 次,弃去上清液;用 4 °C、10 mL 10% 甘油悬浮菌体;4 °C、5 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液;用 1 mL 预冷的 10% 甘油悬浮,分装成每管 70 μ L, -70 °C 保存.

1.5 根癌农杆菌的转化与培养

取 1 μ L 具有潮霉素 B 抗性基因的重组质粒 p50 质粒,加到 70 μ L 根癌农杆菌 AGL1 感受态细胞中,混匀,吸取并加到间距 0.2 cm 电转杯中,擦拭干净,调节电击电压 2.5 kV,电击 5 ms. 将电转化^[8]后的根癌农杆菌涂布于 LB(含 100 μ g/mL 卡那霉素)平板上进行筛选,筛选得到的阳性克隆子在 LB(含 100 μ g/mL 卡那霉素)平板上划线,28 °C 培养 2 d,挑取单菌落接种于 5 mL(含 100 μ g/mL 卡那霉素)的 LB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 培养 16 ~ 20 h,将 1 mL 根癌农杆菌菌液接种于含有相应抗性的 100 mL LB 液体培养基中,按照同等条件继续培养至 A_{600} 为 0.8 备用.

1.6 优化转化条件

将 4 mL ($A_{600} = 0.8$) 根癌农杆菌菌液 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,用 6 mL 含有不同浓度 AS(200、400、600、800 μ mol/L) 的 IM 诱导培养基悬

浮菌体,在不同溶氧条件下(直径 18 mm 试管、25 mL 三角瓶、100 mL 三角瓶)进行不同时间段(2、4、5、6、8 h)诱导培养,取黑曲霉孢子悬液 250 μL ,调节诱导后根癌农杆菌菌液浓度,按黑曲霉孢子与农杆菌不同比例(1 : 1、1 : 10、1 : 100、1 : 1 000)等体积混合均匀,涂布在不同的转化媒介(尼龙膜、硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜、醋酸硝酸混合膜)的 IM 固体培养基上,24 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 48 h,然后将混合体系用无菌水稀释后涂到含有 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 平板上进行初筛,培养 4~5 d,随后转接至 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 进行复筛,每种条件重复 3 次,验证转化子后记录转化子个数.以 10^7 个分生孢子所得到的具有潮霉素 B 外源基因的转化子个数来表示转化效率.具体操作详见文献[7].

1.7 转化子验证及遗传稳定性的验证

提取黑曲霉转化子基因组,以潮霉素 B 抗性基因序列设计引物(见表 1),PCR 方法验证.

表 1 潮霉素 B 引物

Tab. 1 Primers of hygromycin B

引物名称	引物序列(5'-3')
HYG-F	TTTGCCCTCGGACGAGTGCTG
HYG-R	GTCGACGTTAACTGATATTGAAGGAGC

从筛选培养基中随机选取转化子在 CM 培养基中培养传代,转接 15 代以后,提基因组对潮霉素 B 进行 PCR 验证,确定抗性基因的稳定性.

1.8 统计学方法

用 Mintab 16 统计软件进行单因素方差分析.

2 结果与讨论

2.1 黑曲霉对潮霉素 B 的敏感性

根癌农杆菌介导的丝状真菌转化体系的构建可以使用多种形式的受体细胞,如原生质体、分生孢子、菌丝体等^[3],本实验采用了较易制备的分生孢子作为受体.所以用黑曲霉孢子对潮霉素 B 进行敏感性实验.

将黑曲霉孢子悬液涂布于含有不同浓度潮霉素 B 的 CM 培养基中培养,观察菌体生长情况,结果见表 2.随着潮霉素 B 质量浓度增大,黑曲霉的生长逐渐受到抑制,当质量浓度达到 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,黑曲霉已经无法生长.本实验选择 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 为初筛质量浓度,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 为复筛质量浓度.

表 2 黑曲霉 CGMCC 5751 对潮霉素 B 的敏感性

Tab. 2 Sensitivity of *A. niger* CGMCC 5751 to hygromycin B

潮霉素 B 质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	50	100	150	200
黑曲霉生长状况	++	+	—	—

注:++ 表示生长良好,+ 表示生长缓慢,—表示不能生长.

2.2 黑曲霉分生孢子与根癌农杆菌的比例对转化效率的影响

在其他条件一样的情况下,取 $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 黑曲霉孢子悬液 250 μL 与不同浓度根癌农杆菌 250 μL 混合,最终按体积比为 1 : 1、1 : 10、1 : 100、1 : 1 000 充分混匀,涂布在 IM 固体平板上,24 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 48 h,然后转移到 CM 筛选平板(含 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B)上筛选转化子,实验结果如图 1 所示.在一定范围内(1 : 1~1 : 100),黑曲霉分生孢子与根癌农杆菌的比例增加时,转化子的数量随之提高,但是当达到 1 : 1 000 时,转化子的数量反而降低.单因素方差分析显示比例为 1 : 100 时转化效率最佳,与其他各组的差异具有统计学意义($P < 0.01$).然而提高至 1 : 1 000 时转化子反而减少,分析原因是根癌农杆菌浓度过高,与黑曲霉共同竞争培养基中的营养物质,同时也使其转接至选择培养基上后不易被清除,影响转化子的生长^[9].

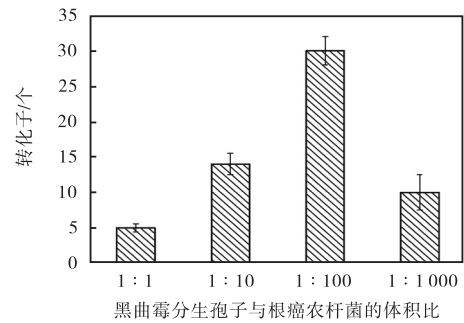


图 1 黑曲霉分生孢子与根癌农杆菌的体积比对转化效率的影响

Fig. 1 Effect of *A. niger* conidia to *A. tumefaciens* ratio on transformation efficiency

2.3 诱导培养基中加入 AS 浓度对转化效率的影响

将 4 mL ($A_{600} = 0.8$) 根癌农杆菌菌液 5 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,用 6 mL 含有不同浓度的 AS(200、400、600、800 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 的 IM 诱导培养基悬浮菌体,在相同的实验条件下进行介导转化,结果如图 2 所示. AS 浓度为 400 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时,转化效率最高,与其他各组的差异具有统计学意义($P < 0.01$).

不同 AS 浓度对根癌农杆菌诱导影响较大,过高

或过低的 AS 浓度都不利于转化的进行,实验设立 4 个不同的浓度梯度对其进行研究,发现当 AS 诱导浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,根癌农杆菌对黑曲霉的转化效率最高. ATMT 是通过根癌农杆菌中 Ti 质粒内毒力区编码的各种蛋白共同作用来实现的,而 AS 对根癌农杆菌中的毒性基因起到诱导或辅诱导作用^[10],激活毒力区基因的表达.在一定浓度范围内,随着 AS 浓度的增加转化效率也随之提升,这与 De Groot 等^[3]的研究结果一致.但当 AS 浓度超过 400 $\mu\text{mol/L}$ 后,随着 AS 浓度的增加转化效率反而下降,其原因可能是 AS 过量会抑制毒蛋白的活性,降低其感染效率,同时过高的 AS 浓度对黑曲霉生长产生一定的抑制,导致转化子数量减少.

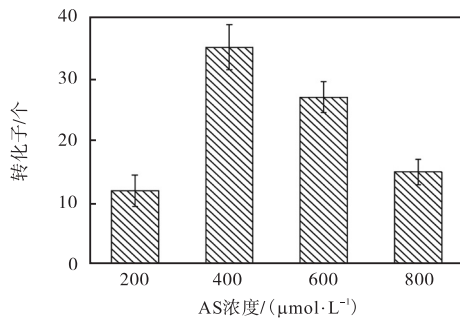


图2 诱导培养基中加入 AS 的浓度对转化效率的影响
Fig. 2 Effect of concentration of AS in inducing medium on transformation efficiency

2.4 诱导根癌农杆菌时溶氧对其转化效率的影响

将 4 mL ($A_{600} = 0.8$) 根癌农杆菌菌液 5 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 用 6 mL 含有 400 $\mu\text{mol/L}$ AS 的 IM 诱导培养基悬浮菌体, 分别于直径 18 mm 试管、25 mL 三角瓶、100 mL 三角瓶中诱导培养至 $A_{600} = 0.8$, 在相同的实验条件下进行介导转化, 结果如图 3 所示. 随着诱导培养时溶氧的增大, 转化效率也随之上升, 差异具有统计学意义 ($P = 0.001$).

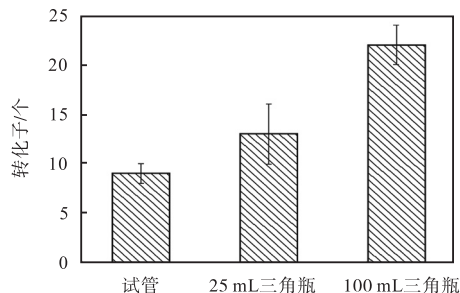


图3 诱导溶氧对转化效率的影响
Fig. 3 Effect of inducing dissolved oxygen on transformation efficiency

根癌农杆菌诱导培养时溶氧的高低对转化效率也产生一定的影响. 随着溶氧的增加, 根癌农杆菌代谢旺盛, 细胞增殖, 活力增强, 其所分泌的毒蛋白活性也相应增强^[11], 使 T-DNA 更容易侵入进宿主细胞内, 转化效率也相应提高.

2.5 诱导时间对转化效率的影响

将 4 mL ($A_{600} = 0.8$) 根癌农杆菌菌液 5 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 用 6 mL 含有 400 $\mu\text{mol/L}$ AS 的 IM 诱导培养基悬浮菌体, 将根癌农杆菌菌液分别诱导培养 2~8 h, 培养后将根癌农杆菌菌体浓度调成一致, 在相同的实验条件下进行介导转化, 结果如图 4 所示. 随着诱导时间的延长, 转化效率也相应增大, 诱导时间为 5 h 效果最好, 低于此时间, 转化效率明显下降, 高于此时间效率有所下降, 并且各组数据间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$). 这说明诱导时间过短或过长都不利于转化介导. 其原因是过长的诱导时间会导致毒蛋白活性下降, 同时也会导致大量假阳性转化子的产生, 而过短的诱导时间又无法激活毒力区基因的表达, 影响转化效率.

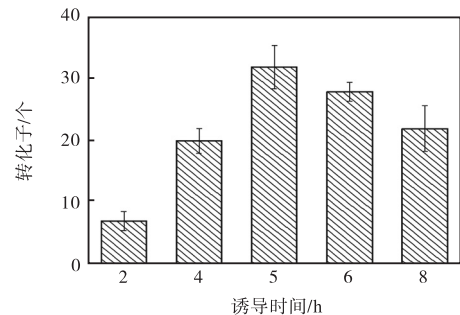


图4 诱导时间对转化效率的影响
Fig. 4 Effect of inducing time on transformation efficiency

2.6 转化媒介对转化效率的影响

取 $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 黑曲霉孢子悬液 250 μL , 与等体积的诱导后根癌农杆菌菌液 ($A_{600} = 0.8$) 混匀, 二者比例为 1:100 分别涂在贴有尼龙膜、硝酸纤维膜、醋酸纤维膜、醋酸硝酸混合膜的 IM 固体诱导培养基上, 24 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 48 h, 然后转移到 CM (150 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素 B) 筛选平板上筛选转化子, 结果如图 5 所示. 硝酸纤维膜转化效果要明显优于其他媒介, 尼龙膜效果最差, 组间具有明显差异 ($P < 0.01$).

能够作为共培养媒介的物质有很多, 如尼龙膜、硝酸纤维膜、玻璃纸等都被报道应用于丝状真菌的转化^[12-15], 其原理是媒介能将菌体与培养基分离, 但不影响菌体对培养基中营养物的吸收及其自身生

长. 本研究结果表明,用硝酸纤维膜进行根癌农杆菌介导黑曲霉要明显优于其他转化媒介,其原因可能是不同的膜具有不同的化学特性与吸附能力,其会影响农杆菌细胞与黑曲霉孢子的相互作用,从而导致转化效率的不同. 硝酸纤维膜转化效果最优可能是由于其对毒性蛋白质具有高度的亲和性^[16].

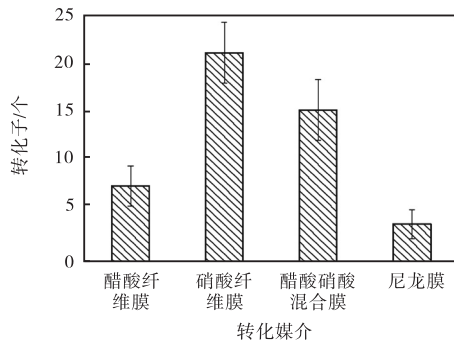
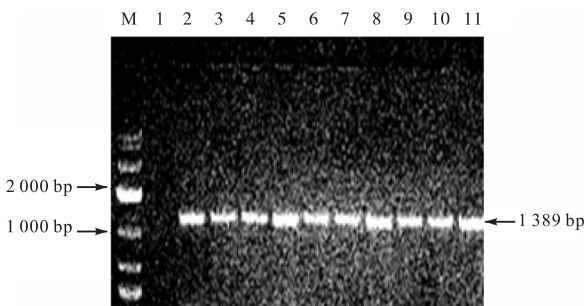


图5 转化媒介对转化效率的影响

Fig. 5 Effect of transformation media on transformation efficiency

2.7 转化子的验证及遗传稳定性鉴定

随机挑取 10 个转化子,提取基因组进行 PCR 验证,10 个转化子均能扩增出潮霉素 B 的片段. 将这 10 个转化子培养 15 代后提取基因组进行 PCR 验证,均能扩增出潮霉素 B 的片段,结果如图 6 所示,转化子的潮霉素基因可以稳定遗传.



M. DL 5 000 DNA marker; 1. 野生型; 2—11. 突变型

图6 黑曲霉 CGMCC 5751 转化子 PCR 结果

Fig. 6 PCR results of the *A. niger* CGMCC 5751 transformants

2.8 根癌农杆菌介导条件优化前后转化效率对比

将各单因素实验的最优条件综合后对黑曲霉进行介导转化实验,并与优化前的实验方法^[4]进行对比,结果见表 3. 10⁷分生孢子中转化子个数从平均 8 个上升至 35 个,并且在筛选平板上转化子生长明显加快($P < 0.01$),转化效率明显提高.

表 3 优化根癌农杆菌介导转化条件前后转化效率的对比
Tab. 3 Comparison of transformation efficiency before and after the optimization of *A. tumefaciens*-mediated transformation conditions

编号	转化子/个	
	优化前	优化后
1	8	34
2	7	38
3	9	36
4	10	33
5	8	35
$\bar{x} \pm S$	8.4 ± 1.14	35.2 ± 1.93

3 结 论

本文利用根癌农杆菌 AGL1 介导侵染黑曲霉,优化其转化条件,尤其是在诱导根癌农杆菌过程中各因素优化成功,进一步验证了根癌农杆菌转化体系对丝状真菌的可行性. 通过本实验得出添加 400 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮,100 mL 摇瓶诱导根癌农杆菌 AGL1 培养 5 h,调节黑曲霉孢子与根癌农杆菌体积比为 1 : 100,用共培养媒介硝酸纤维膜,根癌农杆菌 AGL1 介导侵染黑曲霉效果最好,10⁷个分生孢子中黑曲霉转化子可达 35 个,相比于优化前的转化方法,转化效率提高了 78%. 农杆菌介导丝状真菌转化体系的确立,克服了原有丝状真菌转化体系操作繁杂、转化效率低、耗时多等缺点. 通过研究影响根癌农杆菌介导黑曲霉转化条件的优化,基本上确立了该方法在黑曲霉遗传转化上的一些特性,虽然对于不同的曲霉,其最优的转化条件存在着一定的差异,但对于丝状真菌遗传转化系统的建立具有重要的参考价值.

参考文献:

[1] Pel H J, De Winde J H, Archer D B, et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(2): 221-231.

[2] Klee H, White F, Iyer V, et al. Mutational analysis of the virulence region of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid[J]. Journal of Bacteriology, 1983, 153(2): 878-883.

[3] De Groot M J, Bundock P, Hooykaas P J, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16(9): 839-842.

[4] 黎明, 刘萌, 黄云雁, 等. 根癌农杆菌介导的黑曲霉遗传转化

- 传转化体系的建立及优化[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1): 56-63.
- [5] 郭慧,杨哲,邢来君,等. 根癌农杆菌介导的日本曲霉转化体系的建立[J]. 微生物学报, 2011, 51(1): 115-121.
- [6] 龙朝钦,邓军,郝飞,等. 根癌农杆菌介导的烟曲霉转化条件的优化[J]. 西部医学, 2008, 20(2): 261-264.
- [7] Michielse C B, Hooykaas P J, van den Hondel C A, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*[J]. Nature Protocols, 2008, 3(10): 1671-1678.
- [8] Tariq M, Tamkina Z, Saqlan Naqvi S M. Multiple pulses improve electroporation efficiency in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2008, 11(1): 1-4.
- [9] Zeilinger S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Current Genetics, 2004, 45(1): 54-60.
- [10] Combier J P, Melayah D, Raffier C, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 220(1): 141-148.
- [11] Leclerque A, Wan H, Abschütz A, et al. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Current Genetics, 2004, 45(2): 111-119.
- [12] Gelvin S B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration[J]. Annual Review of Plant Biology, 2000, 51(1): 223-256.
- [13] Banta L M, Joerger R D, Howitz V R, et al. Glu-255 outside the predicted ChvE binding site in VirA is crucial for sugar enhancement of acetosyringone perception by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(11): 3242-3249.
- [14] Chen H, Hu C, Yi K, et al. Cloning of insertion site flanking sequence and construction of transfer DNA insert mutant library in *Stylosanthes colletotrichum*[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e111172.
- [15] Sugui J A, Chang Y C, Kwon-Chung K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: An efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 1798-1802.
- [16] 张泓,王亚东,赖卓胜. 硝酸纤维素膜在细胞培养和染色中的应用[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(1): 89-90.

责任编辑: 郎婧