生物资源　2026,48(5):509～519
Biotic Resources

研究报告

DOI:10.14188/j.ajsh.20260057

农杆菌介导草酸青霉SG-4转化体系的构建及其在三峡肽素生物合成关键基因功能验证中的应用

杨江帆[1],熊人庆[1],张极峰[1],乔国峰[1],白晓轩[1,2],刘士平[1*]

(1. 三峡大学 生物与制药学院,湖北 宜昌 443002;
2. 三峡大学 水利与环境学院,湖北 宜昌 443002)

摘要:建立适用于草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)SG-4的高效稳定根癌农杆菌介导遗传转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation,ATMT)体系,并评价其在功能基因研究中的适用性,本研究通过潮霉素B敏感性测定确定转化子筛选条件,采用单因素试验对乙酰丁香酮(acetosyringone,AS)预诱导、共培养AS浓度、农杆菌浓度、受体孢子浓度、共培养温度及时间等参数进行优化,并对转化子进行PCR鉴定和遗传稳定性分析。在此基础上,利用优化后的ATMT体系对三峡肽素候选生物合成基因簇中的*PDE_01064*、*PDE_01069*、*PDE_01071*和*PDE_01073*进行RNA干扰,并采用HPLC检测干扰株发酵液中三峡肽素浓度。结果表明,草酸青霉SG-4对潮霉素B的最低抑菌浓度为50 μg/mL;农杆菌经200 μmol/L AS预诱导后,以OD_{600}=0.6～0.8的菌液与1×10^6 spores/mL的SG-4孢子悬液等体积混合,在含200 μmol/L AS的诱导培养基上25 ℃避光共培养48 h,可获得较好的转化效果,所得转化子经PCR验证并在无选择压力下连续传代5代后仍保持潮霉素抗性。利用该体系成功获得上述4个候选基因的RNA干扰株,各组6株干扰株发酵液中三峡肽素平均浓度分别为6.64、2.83、5.38和2.61 μg/mL,均低于野生型SG-4的23.29 μg/mL。结果表明,所建立的ATMT体系可用于草酸青霉SG-4的遗传操作和功能基因研究,并支持*PDE_01064*、*PDE_01069*、*PDE_01071*和*PDE_01073*参与三峡肽素的生物合成。

关键词:草酸青霉;农杆菌介导转化;RNA干扰;三峡肽素;生物合成基因簇
中图分类号:Q933　　文献标志码:A　　文章编号:2096-3491(2026)05-0509-11

Construction of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for *Penicillium oxalicum* SG-4 and its application in functional verification of key genes in Sanxiapeptin biosynthesis

YANG Jiangfan[1], XIONG Renqing[1], ZHANG Jifeng[1], QIAO Guofeng[1], BAI Xiaoxuan[1,2], LIU Shiping[1*]

(1. College of Biology & Pharmacy Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China;
2. College of Hydraulic & Environmental Engineering, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China)

Abstract: To establish an efficient and stable *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) system for *Penicillium oxalicum* SG-4 and evaluate its applicability to functional gene analysis, hygromycin B sensitivity assays were first performed to determine the selection conditions for transformants. Single-factor experiments were then

收稿日期:2026-08-30　修回日期:2026-09-26　接受日期:2026-10-19
作者简介:杨江帆(1993-),男,硕士生,研究方向为丝状真菌遗传改造,E-mail:m18372502915@163.com
*通信作者:刘士平(1974-),男,教授,研究方向为真菌次级代谢产物开发与应用,E-mail:liuspain@ctgu.edu.cn
基金项目:国家自然科学基金项目(31540065;31270389)

引用格式:杨江帆,熊人庆,张极峰,等. 农杆菌介导草酸青霉SG-4转化体系的构建及其在三峡肽素生物合成关键基因功能验证中的应用[J]. 生物资源, 2026, 48(5): 509-519.
Yang J F, Xiong R Q, Zhang J F, et al. Construction of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for *Penicillium oxalicum* SG-4 and its application in functional verification of key genes in Sanxiapeptin biosynthesis [J]. Biotic Resources, 2026, 48(5): 509-519.

conducted to optimize key parameters affecting transformation efficiency, including acetosyringone (AS) pre-induction, AS concentration during co-cultivation, *Agrobacterium* cell density, recipient spore concentration, co-cultivation temperature, and co-cultivation duration. The resulting transformants were further subjected to PCR verification and genetic stability analysis. Subsequently, the optimized ATMT system was applied to RNA interference (RNAi) of four candidate genes, *PDE_01064*, *PDE_01069*, *PDE_01071*, and *PDE_01073*, within a candidate biosynthetic gene cluster for Sanxiapeptin, and the concentrations of Sanxiapeptin in the fermentation broths of the RNAi strains were determined by HPLC. The results showed that the minimum inhibitory concentration of hygromycin B against *P. oxalicum* SG-4 was 50 μg/mL. Favorable transformation efficiency was achieved when *Agrobacterium* cells were pre-induced with 200 μmol/L AS, adjusted to an OD_{600} of 0.6 - 0.8, mixed at an equal volume with an SG-4 spore suspension at 1×10^6 spores/mL, and co-cultivated in the dark at 25 ℃ for 48 h on induction medium containing 200 μmol/L AS. The selected transformants were confirmed by PCR and retained hygromycin B resistance after five successive passages under non-selective conditions. RNAi strains targeting the four candidate genes were successfully obtained using the optimized ATMT system. The mean Sanxiapeptin concentrations in the fermentation broths of six RNAi strains for *PDE_01064*, *PDE_01069*, *PDE_01071*, and *PDE_01073* were 6.64, 2.83, 5.38, and 2.61 μg/mL, respectively, all lower than that of the wild-type SG-4 strain (23.29 μg/mL). These results demonstrate that the established ATMT system is suitable for genetic manipulation and functional gene analysis in *P. oxalicum* SG-4 and support the involvement of *PDE_01064*, *PDE_01069*, *PDE_01071*, and *PDE_01073* in Sanxiapeptin biosynthesis.

Key words: *Penicillium oxalicum*; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT); RNA interference; Sanxiapeptin; biosynthetic gene cluster

0 引 言

草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)是一种广泛分布于土壤和植物根际环境中的丝状真菌,在纤维素降解、难溶性磷活化以及活性次级代谢产物合成等方面具有重要应用潜力[1-4]。随着真菌基因组学和转录组学研究的不断深入,大量与次级代谢调控相关的候选基因被发掘[5-8]。然而,适用于草酸青霉的高效、稳定遗传操作体系仍相对有限,使部分候选基因难以通过遗传学手段进行直接功能验证,加之大批优异的功能靶向基因在草酸青霉中仍处于沉默或低表达状态,在一定程度上限制了其功能基因鉴定和次级代谢调控机制研究[9-10]。

目前,丝状真菌遗传转化常采用聚乙二醇介导的原生质体法、电击转化法、基因枪法以及根癌农杆菌介导遗传转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation,ATMT)等方法[11-14]。其中,原生质体法和电击转化法对原生质体制备条件要求较高,存在操作烦琐、再生效率低及转化稳定性不足等问题;基因枪法则存在仪器设备成本较高等局限[13-15]。根癌农杆菌介导的遗传转化利用农杆菌的Ti质粒T-DNA转移系统将外源DNA导入受体细胞并整合至其基因组,可直接以分生孢子、菌丝体等作为受体,无须进行原生质体制备,具有操作相对简便、受体类型广和转化子遗传稳定性较好等特点,因此已成为丝状真菌遗传操作的重要技术手段之一[16-19]。

目前,ATMT已广泛应用于曲霉、镰刀菌和青霉等的遗传操作[20-24]。然而,农杆菌对真菌的侵染及T-DNA转移过程受供受体生理状态和共培养条件等多种因素影响,不同真菌在细胞壁组成、生长特性及环境响应等方面存在差异。因此,ATMT转化效率通常具有明显的物种和菌株依赖性[17]。以青霉为例,海洋特异性草酸青霉、梅花状青霉或产黄青霉在乙酰丁香酮(acetosyringone,AS)浓度、农杆菌浓度、受体浓度、共培养温度及时间等条件下表现出不同的适宜转化参数[25-27]。因此,针对特定草酸青霉菌株建立并优化相应的ATMT体系,是开展后续遗传改造和功能基因研究的基础。

本课题组前期分离到的草酸青霉SG-4能够产生具有抗真菌活性的三峡肽素(Sanxiapeptin)。基于SG-4全基因组次级代谢基因簇预测,并结合转录组及相关基因表达分析,筛选出一个可能参与三峡肽素生物合成的候选基因簇,其中*PDE_01064*、*PDE_01069*、*PDE_01071*和*PDE_01073*被选为候选关键基因[28-30]。功能注释结果显示,*PDE_01071*编码非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase,NRPS),候选基因簇中还含有多个可能参与氧化修饰和肽类组装的基因;其中,*PDE_01064*被注释为细胞色素P450,*PDE_01069*和*PDE_01073*被注释为O-甲基转移酶,提示该基因簇可能与三峡肽素生物合成有关。因此有必要通过遗传学手段进

一步评价相关基因与三峡肽素生物合成之间的关系。本研究以草酸青霉SG-4为受体，对ATMT过程中预诱导、共培养AS浓度、农杆菌浓度、共培养温度、共培养时间、农杆菌起始浓度及受体孢子浓度等关键参数进行优化。在建立稳定遗传转化体系的基础上，进一步利用该体系对*PDE_01064*、*PDE_01069*、*PDE_01071*和*PDE_01073*进行RNA干扰，并结合干扰株三峡肽素产量变化评价相关基因与三峡肽素生物合成的关系，从而验证所建立ATMT体系在草酸青霉功能基因研究中的适用性。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与质粒

受体菌草酸青霉SG-4由本实验室保藏；根癌农杆菌LBA4404感受态和大肠杆菌Stbl3感受态购自上海唯地生物。用于真菌整合的高效双元干扰载体为pCAMBIA1300-dual，由本实验室自行构建。

1.2 培养基配制

TSA固体培养基：胰蛋白胨15 g/L、大豆蛋白胨5 g/L、葡萄糖2 g/L、NaCl 5 g/L、琼脂13 g/L。

IM培养基：K_2HPO_4 2.05 g/L、KH_2PO_4 1.45 g/L、NaCl 0.15 g/L、$MgSO_4•7H_2O$ 0.5 g/L、$CaCl_2•2H_2O$ 67 mg/L、$FeSO_4•7H_2O$ 2.5 mg/L、$(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g/L、葡萄糖2 g/L、50%甘油1 mL、1 mol/L MES 40 mL。

LB培养基：胰蛋白胨10 g/L、酵母提取物5 g/L、NaCl 10 g/L；固体培养基在此基础上加入1.5%琼脂。

PDB培养基：去皮马铃薯200 g煮沸过滤，取上清液，加入20 g葡萄糖，自来水定容至1 L，pH值自然，121 ℃灭菌20 min；固体培养基在此基础上加入1.5%琼脂。

抗生素储备液：卡那霉素(KAN，50 mg/mL)、利福平(RIF，5 mg/mL DMSO)、头孢噻肟钠(CTX，100 mg/mL)、潮霉素B(Hyg，50 mg/mL)、乙酰丁香酮(AS，100 mmol/L DMSO)。上述母液经微孔滤膜(0.22 μm)过滤除菌，避光保存于−20 ℃冰箱。

1.3 草酸青霉分生孢子悬液制备

将活化的草酸青霉SG-4接种于新鲜配制的PDA平板上，28 ℃恒温培养6 d后，向平板加入3 mL无菌生理盐水，用无菌涂布棒在PDA表面轻柔刮擦，洗脱孢子获得灰绿色分生孢子悬浮液。孢子液通过4层擦镜纸过滤以剔除多余菌丝块，显微镜下采用血球计数板计数，并用生理盐水稀释至指定浓度。

1.4 潮霉素抗性敏感度测试

配制含有0、25、50、75、100、150 μg/mL潮霉素B的PDA平板，涂布200 μL(1×10^6 spores/mL)孢子悬液，28 ℃培养3 d，观察菌丝和孢子生长情况，将完全抑制草酸青霉生长的最低潮霉素B浓度作为转化子筛选时的浓度。

1.5 重组双元质粒转化农杆菌感受态及菌落PCR验证

取农杆菌感受态于冰水混合物中，注入1 μg pCAMBIA1300-dual质粒。轻轻叩击混匀，冰浴5 min，液氮速冷5 min，37 ℃热激5 min，冰浴2 min。随后注入400 μL无抗LB液体培养基，28 ℃ 200 rpm振荡培养2 h，涂布于含有50 μg/mL卡那霉素和25 μg/mL利福平的双抗LB平板，28 ℃孵育约36 h至单菌落长出。挑取抗性菌落，接种至双抗LB液体培养基培养24 h，取菌液作为模板直接PCR验证。PCR反应体系为PCR Mix 25 μL、PtrpC和HygR引物(10 μmol/L)各2 μL、菌液1 μL、补水至50 μL。反应程序为98 ℃预变性2 min，98 ℃变性10 s、55 ℃退火15 s、72 ℃延伸10 s/kb，共30次循环，72 ℃延伸2 min。引物序列见表1。产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

表1 引物序列及产物片段大小

Table 1 Primer sequences and product fragment sizes

引物名称	引物序列(5'→3')	产物片段大小/bp
cxF	CGTCCAAATATCGTGCCTC	536
cxR	GGAGCTGACATCGACACCAA	
PtrpC	CACGATAACTTGGTGCGTTT	271
HygR	GCCCTCCTACATCGAAGCTG	
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1 465
1492R	GGTTACCTTGTTACGACT	

1.6 农杆菌介导草酸青霉转化体系的流程及优化

农杆菌转化法的操作过程主要包括受体菌孢子悬浮液制备、农杆菌菌液培养、共培养、筛选与复筛转化子等[18]。本文主要研究了草酸青霉的农杆菌转化过程中，进行预培养、共培养AS浓度、共培养过程中农杆菌初始OD值、草酸青霉初始孢子浓度、共培养温度、共培养时间等条件的优化。

1.6.1 阳性农杆菌避光预培养

将含有pCAMBIA1300-dual质粒的根癌农杆菌单克隆接种在含有50 μg/mL卡那霉素、25 μg/mL

利福平的LB培养基中,28 ℃ 200 rpm过夜培养,转接至含有200 μmol/L AS的IM诱导培养基中使OD_{600}达到0.15,在IM中生长不同的持续时间,使OD_{600}分别达到0.2、0.4、0.6、0.8和1.0。同时进行不添加AS的阴性对照,其他条件均保持不变。

1.6.2 草酸青霉孢子与农杆菌菌液混合共培养

将称量纸平铺在含0,100,200,300,400 μmol/L AS的IM平板上,并用无菌涂布棒将称量纸与培养基之间的气泡排净。取新鲜制备的培养6 d的草酸青霉孢子悬浮液,使其分别稀释至10^4、10^5、10^6、10^7、10^8孢子/mL,将100 μL孢子悬浮液与等体积的农杆菌菌液充分混匀,涂布在含AS的IM平板中的称量纸上,并在20、22、25、28、30 ℃下在黑暗中共培养24、36、48、60、72 h。

1.6.3 共培养结束后的初筛与复筛

共培养结束后,转膜至含500 μg/mL CTX、50 μg/mL潮霉素B的TSA初筛培养基,继续培养3~5 d至草酸青霉长出,挑单菌落转接至含100 μg/mL潮霉素B的TSA复筛培养基上复筛3次,对生长稳定的单菌落进行保藏。

1.7 草酸青霉转化株鉴定

1.7.1 转化株表型分析与统计

将转膜后的初筛培养基培养3~5 d,直至草酸青霉转化子长出较多不连接成片的单克隆,观察单克隆形态并计数,以转化子个数为依据评估最佳条件,进行3组生物学平行并计算平均值和相对偏差,结果保留一位小数,使用Origin Pro 2021进行数据处理并绘图。显著性水平设定为$P<0.05$。

1.7.2 转化株基因组DNA提取及PCR鉴定

随机选取8个草酸青霉转化子,摇瓶培养后提取各转化子的基因组DNA,对每个转化子进行cxF-cxR、PtrpC-HygR、27F-1492R三对引物的检测,引物序列见表1,PCR反应体系和循环条件同§1.5节。

1.7.3 转化株潮霉素耐受性及遗传稳定性检测

将PCR结果为阳性的草酸青霉转化子接种于不含潮霉素的PDA平板上,28 ℃恒温培养,当菌落培养约24 h后,挑取边缘部分菌丝进行传代,如此往复传代5次,随后在第6代筛选潮霉素抗性菌株,并与野生型作对比,确定转化子的遗传稳定性。

1.8 ATMT体系在三峡肽素生物合成相关基因功能分析中的应用

1.8.1 RNA干扰载体构建

根据前期对三峡肽素候选生物合成基因簇的分析结果,选取*PDE_01064*、*PDE_01069*、*PDE_01071*和*PDE_01073*作为RNA干扰靶基因。根据草酸青霉SG-4基因组序列设计相应引物,以SG-4基因组DNA为模板扩增各靶基因干扰片段,用于RNA干扰载体构建。使用Xho I/Hind Ⅲ和Sph I/Kpn I构建正、反向干扰片段,并将干扰片段通过无缝克隆插入pCAMBIA1300-dual载体中。RNA干扰载体的ATMT转化及转化子鉴定采用§1.6节优化后的ATMT条件进行。

1.8.2 干扰株发酵及三峡肽素检测

分别收集*PDE_01064*、*PDE_01069*、*PDE_01071*和*PDE_01073* RNA干扰株及野生型SG-4的新鲜分生孢子,制备孢子悬液并调整浓度至1×10^6孢子/mL。将孢子悬液分别接种于装有200 mL PDB液体培养基的500 mL三角瓶中,于28 ℃、120 rpm条件下振荡培养7 d。培养结束后收集发酵液,用于三峡肽素含量检测。

采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)检测三峡肽素[3132]。色谱仪为Shimadzu LC-16高效液相色谱仪,配紫外检测器,采用手动进样模式;色谱柱为COSMOSIL-Pack C_8-MS-Ⅱ柱(5 μm,250 mm×4.6 mm)。以水和乙腈为流动相,30 min内由90%水相梯度洗脱至100%乙腈,流速1.0 mL/min,检测波长210 nm,柱温20 ℃,进样量50 μL。根据三峡肽素色谱峰的峰面积计算样品中三峡肽素浓度,结果保留两位小数。

2 结果与分析

2.1 潮霉素B敏感性分析

筛选标记的确定是转化体系成功的前提。实验结果显示(表2),草酸青霉SG-4在PDA平板上对潮霉素B敏感。当潮霉素B浓度为25 μg/mL时,菌株仍可少量生长,提高至50 μg/mL及以上时,孢子萌发被完全抑制。适当提高抗性筛选浓度会降低转化子假阳性的概率,但是过高又会降低获得转化子的数量,甚至直接杀死转化子。为平衡假阳性率与转化效率,确定初筛浓度为50 μg/mL,复筛浓度提升至100 μg/mL,以获得高抗性水平的稳定转化子。

表2 草酸青霉SG-4的潮霉素B抗性评价

Table 2 Evaluation of hygromycin B resistance of *P. oxalicum* SG-4

潮霉素浓度/(μg·mL^{-1})	0	25	50	75	100	150
SG-4生长情况	+++	+	−	−	−	−

+++为生长茂盛;+为生长微弱;−为完全抑制

+++ means vigorous growth ; + means weak growth; − means completely antifungal

2.2 阳性农杆菌菌落PCR

将重组质粒pCAMBIA1300-dual转入根癌农杆菌LBA4404后，挑选农杆菌单克隆，用含50 μg/mL卡那霉素，25 μg/mL利福平的LB液体培养基培养后进行菌液PCR，产物经1%琼脂糖凝胶电泳，结果如图1所示。除5、11泳道外，其他单克隆均能扩增出预期大小条带，表明重组质粒已成功导入农杆菌，阳性率达到88.2%，可用于后续转化实验。

2.3 农杆菌介导转化条件优化

2.3.1 AS预诱导对转化效率的影响

比较农杆菌预培养阶段添加与不添加AS的处理，结果如图2所示，未添加AS时获得转化子数量为每个平板(16.7±6.2)个，而加入200 μmol/L AS后，转化子的数量增加至每个平板(168.3±4.5)个。因此，后续实验采用200 μmol/L AS进行预培养。

2.3.2 共培养过程中AS浓度的优化

不同AS浓度对草酸青霉转化效率的影响结果如图3所示。当AS浓度由0增加至100 μmol/L时，转化子数量由0增加至每个平板(149.7±9.8)个；继续提高至200 μmol/L时，转化子数量达到每个平板(168.3±4.5)个；进一步提高至300 μmol/L和400 μmol/L后，转化子数量分别为每个平板(174.0±4.1)和(176.3±4.5)个，与200 μmol/L处理相比差异不显著。因此，选择200 μmol/L AS作为共培养阶段的AS添加浓度。

2.3.3 共培养温度的优化

不同共培养温度下的转化效率结果如图4所示。在20～30 ℃，转化子数量随温度升高呈先增加后下降趋势。20 ℃、22 ℃、25 ℃、28 ℃和30 ℃条件下获得的转化子数量分别为每个平板(137.3±7.4)、(163.0±5.4)、(178.3±9.9)、(117.0±5.4)和(60.7±5.7)个。其中25 ℃条件下转化子数量最高，因此选择25 ℃作为共培养温度。

2.3.4 共培养时间的优化

不同共培养时间对转化效率的影响结果如图5所示。随着共培养时间由24 h延长至48 h，转化子数量由每个平板(7.7±2.5)个增加至(121.7±5.6)个。继续延长至72 h时，平板上菌落生长过于密集，不利于计数和单克隆分离。综合考虑转化效率及后续筛选便利性，确定48 h作为适宜共培养时间。

2.3.5 农杆菌浓度的优化

不同农杆菌初始浓度条件下的转化效率结果如图6所示。当农杆菌初始OD_{600}由0.2增加至0.6时，转化子数量由每个平板(22.3±3.3)个增加至(121.7±5.6)个；对数生长期的农杆菌更有利于T-DNA转移；而OD_{600}为1时，转化子数量减少至每个平板(98±11)个。因此，选择OD_{600}为0.6～0.8作为共培养时的农杆菌浓度。

2.3.6 受体孢子浓度的优化

不同初始孢子浓度对转化效率的影响如图7所示。当孢子浓度由1×10^4 spores/mL增加至1×10^5孢子/mL和1×10^6孢子/mL时，转化子数量由每个平板(1.3±1.2)增加至(30.3±4.0)和(121.7±5.6)个。而当浓度达到10^7孢子/mL及以上时，平板被大量菌落覆盖，不利于单克隆计数和分离。因此，确定1×10^6孢子/mL为适宜受体孢子浓度。

2.4 转化子鉴定与稳定性

2.4.1 转化株表型分析与统计

转膜至初筛培养基培养4 d后，抗性平板上的称量纸上生长出较多单克隆，如图8所示。生长较慢的转化子普遍呈现菌丝态，而生长较快的转化子在菌落中央出现分生孢子。

2.4.2 转化株基因组DNA提取与PCR检测

对随机选取的8个转化子进行cxF-cxR、PtrpC-HygR、27F-1492R三对引物的检测，经琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图9所示。cxF-cxR引物扩增出

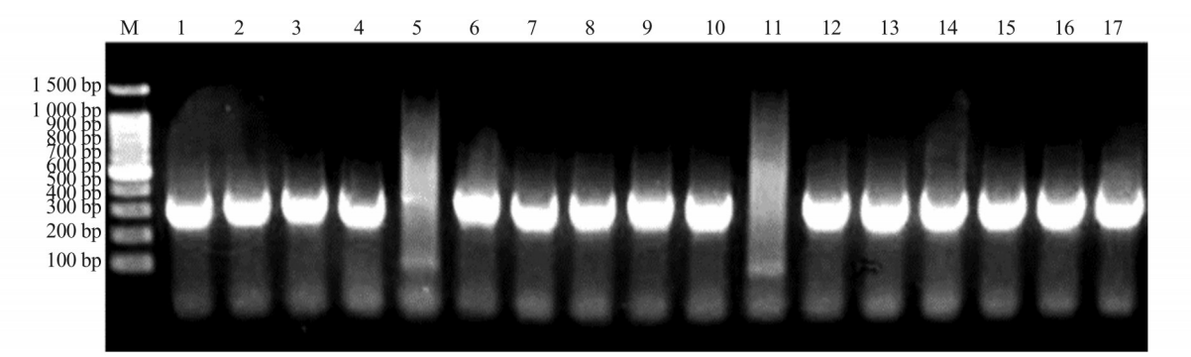


图1 农杆菌单克隆菌落PCR电泳图

Figure 1 Colony PCR electrophoresis of *A. tumefaciens* transformants

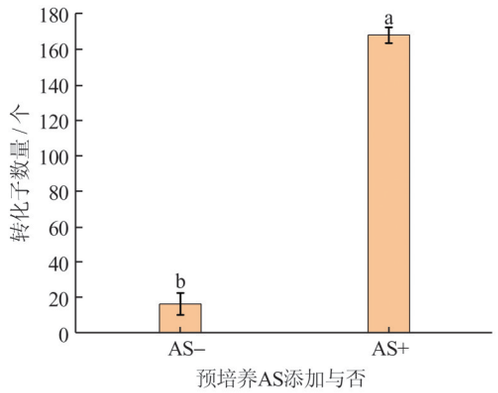


图 2　预培养对转化效率的影响

Figure 2　Effect of pre-induction treatment on transformation efficiency

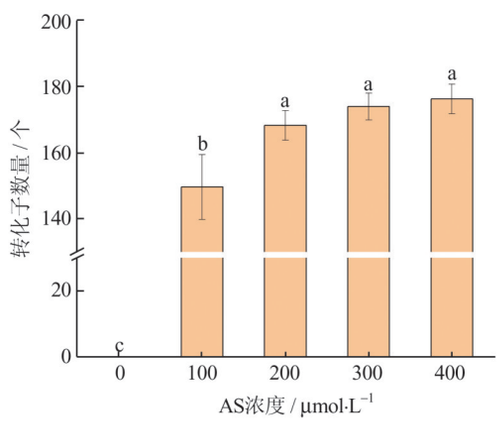


图 3　共培养过程中 AS 浓度对转化效率的影响

Figure 3　Effect of AS concentration during co-cultivation on transformation efficiency

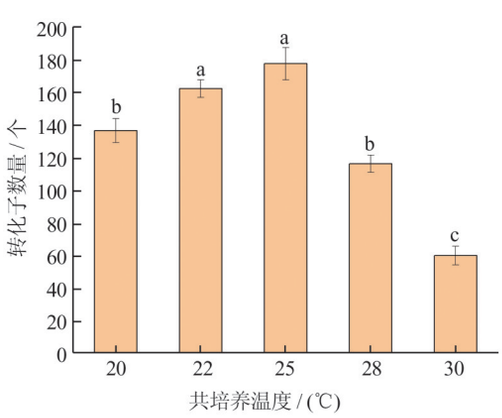


图 4　共培养温度对转化效率的影响

Figure 4　Effect of co-cultivation temperature on transformation efficiency

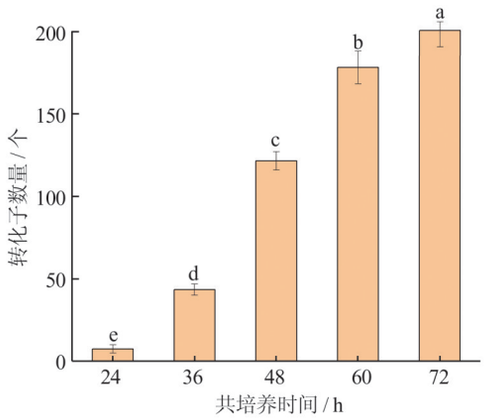


图 5　共培养时间对转化效率的影响

Figure 5　Effect of co-cultivation duration on transformation efficiency

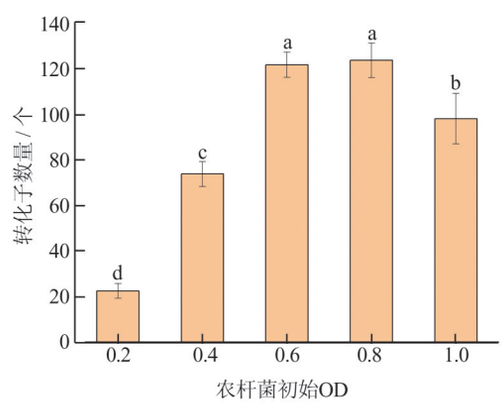


图 6　农杆菌初始 OD 对转化效率的影响

Figure 6　Effect of initial *A. tumefaciens* concentration on transformation efficiency

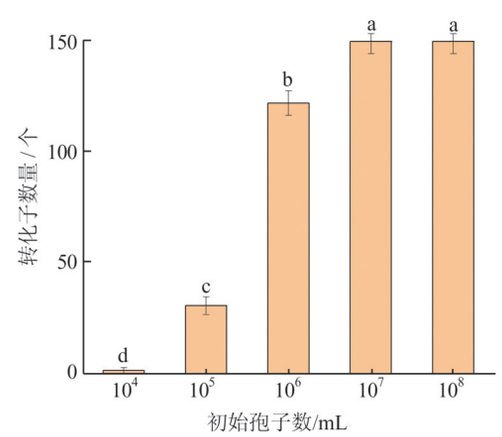


图 7　初始孢子数对转化效率的影响

Figure 7　Effect of initial spore concentration on transformation efficiency

目标大小的片段,说明目标片段存在于草酸青霉的基因组 DNA 中;PtrpC-HygR 引物扩增出目标大小的片段,说明菌株的潮霉素抗性是本实验中人为引进的;27F-1492R 引物没有扩增出目标大小的片段,说明农杆菌被完全除净,即证明插入片段是来自草酸青霉的基因组 DNA 的,而非农杆菌的 Ti 质粒。综上所述,Ti 质粒的 T-DNA 区被成功导入转化子的基因组 DNA 上,且复筛过程未检测到农杆菌残留。

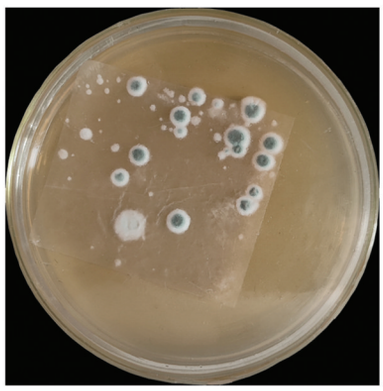


图8 共培养转膜后的草酸青霉转化子

Figure 8 Transformants of *P. oxalicum* after membrane transfer

2.4.3 转化株潮霉素耐受性及遗传稳定性检测

经检测，连续在不含抗性的平板上传代5次后的转化株仍然能在100 μg/mL的潮霉素抗性平板上稳定生长。如图10所示，虽然不同转化子的产孢能力和菌丝径向生长能力有差异，但每个转化子的传代过程中表型无明显变化，潮霉素抗性稳定，说明本实验中农杆菌介导获得的转化子的遗传稳定性均良好。

2.5 优化ATMT体系在三峡肽素生物合成相关基因功能分析中的应用

2.5.1 候选关键基因RNA干扰株的获得

采用优化后的ATMT体系分别将*PDE_01064*、*PDE_01069*、*PDE_01071*和*PDE_01073*的RNA干扰载体导入草酸青霉SG-4，经抗性筛选、复筛及PCR鉴定后均获得相应阳性转化子。以*PDE_01069*为例，九株干扰株单克隆的PCR检测如图11。各基因分别选取6株阳性转化子用于后续发酵及三峡肽素检测。

2.5.2 关键基因干扰对三峡肽素产量的影响

将*PDE_01069*、*PDE_01064*、*PDE_01071*和*PDE_01073*各6株RNA干扰株与野生型SG-4在PDB培养基中发酵，并通过HPLC检测发酵液中的三峡肽素含量，如图12。野生型SG-4发酵液中三峡肽素浓度为23.29 μg/mL，而4组RNA干扰株中三峡肽素浓度均低于野生型。*PDE_01064*干扰株浓度为3.23～9.62 μg/mL，6株平均浓度为6.64 μg/mL，为野生型的28.5%；*PDE_01069*干扰株的三峡肽素浓度为0.50～4.42 μg/mL，平均为2.83 μg/mL，为野生型的12.2%；*PDE_01071*干扰株浓

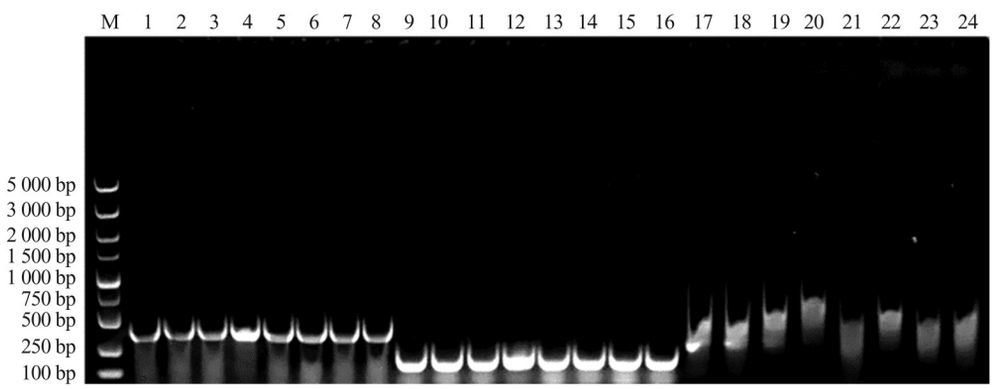
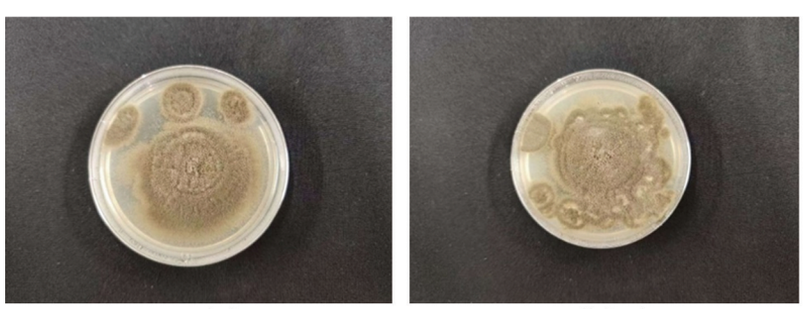


图9 转化子PCR检测

Figure 9 PCR identification of transformants

M：DNA marker；1～8：cxF-cxR；9～16：PtrpC-HygR；17～24：27F-1492R



(a) 初代 (b) 传代5次

图10 草酸青霉SG-4转化株在5次连续传代前后的生长形态

Figure 10 Growth morphology of a representative *P. oxalicum* SG-4 transformant before and after five passages

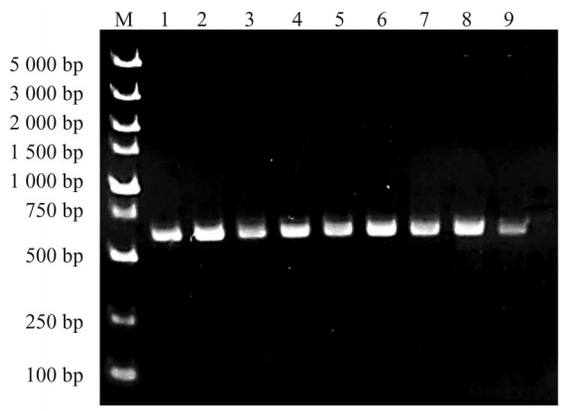


图11 草酸青霉SG-4干扰株的PCR检测

Figure 11 PCR identification of RNAi strains of *P. oxalicum* SG-4

M:DNA marker; 1~9:9株PDE_01069干扰株检测

度为3.30～7.62 μg/mL,平均为5.38 μg/mL,为野生型的23.1%;*PDE_01073*干扰株浓度为0.86～4.59 μg/mL,平均为2.61 μg/mL,为野生型的11.2%。与野生型相比,4类干扰株的平均三峡肽素浓度分别降低约71.5%、87.8%、76.9%和88.8%。上述结果表明,对*PDE_01064*、*PDE_01069*、*PDE_01071*和*PDE_01073*进行RNA干扰后,三峡肽素积累水平均出现明显下降,支持上述4个基因与三峡肽素生物合成相关。

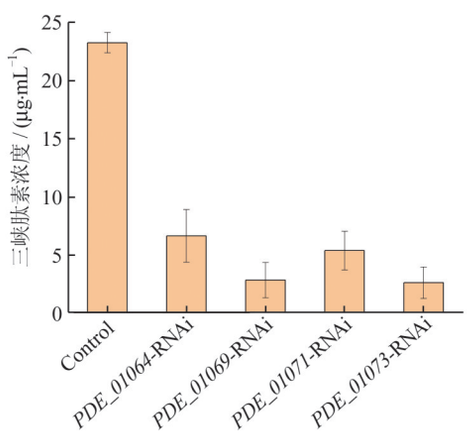


图12 草酸青霉SG-4及其各干扰株的三峡肽素产量

Figure 12 Sanxiapeptin yield of *P. oxalicum* SG-4 and its RNAi strains

3 讨 论

根癌农杆菌介导遗传转化涉及宿主识别、vir基因诱导、T-DNA加工与转运以及外源DNA整合等多个连续过程,因此供体农杆菌和受体真菌的生理状态以及共培养条件均可能影响最终转化效率[33-35]。不同丝状真菌在细胞壁组成、孢子萌发特性及环境适应性等方面存在差异,使ATMT体系具有明显的物种和菌株依赖性[36-37]。因此,针对特定受体菌株对关键转化参数进行系统优化,是提高转化效率和重复性的必要环节。本研究通过对AS预诱导、共培养AS浓度、农杆菌浓度、受体孢子浓度、共培养温度和时间等因素进行优化,建立了适用于草酸青霉SG-4的ATMT体系。

AS是影响农杆菌T-DNA转移的重要诱导因子,可通过VirA/VirG双组分调控系统诱导vir基因表达,从而促进T-DNA加工和转运[18]。已有研究表明,AS浓度不足时难以充分诱导*vir*基因表达,而浓度过高则可能影响菌体正常生理状态。因此,AS需要控制在适宜范围内[38-39]。本研究中,农杆菌经AS预诱导后获得的转化子数量明显高于未经AS预诱导的处理,说明预诱导有利于提高SG-4的转化效率。进一步提高共培养体系中AS浓度时,转化子数量在200 μmol/L后趋于稳定,300和400 μmol/L处理与200 μmol/L相比未表现出进一步的明显提高。因此,从转化效果及试剂用量综合考虑,200 μmol/L可作为本体系较适宜的AS浓度。该结果与部分青霉属真菌ATMT研究中报道的AS适宜浓度范围较为接近,但不同真菌甚至同一物种不同菌株之间仍可能存在差异,进一步说明针对具体受体菌株优化转化条件的必要性。

供体和受体浓度是影响农杆菌与真菌细胞有效接触及T-DNA转移的重要因素。本研究结果显示,随着农杆菌浓度增加,转化子数量首先增加,在OD_{600}为0.6～0.8时获得较好的转化效果,而进一步提高农杆菌浓度后转化效率下降。这可能与适宜的农杆菌生理状态有利于侵染和T-DNA转移有关,而过高的菌体密度可能造成菌体过度生长或增加共培养体系中的竞争,不利于有效转化及后续转化子分离。受体孢子浓度同样表现出明显的浓度效应,当孢子浓度提高至1×10^6 spores/mL时能够获得较多且便于分离的转化子,而继续提高孢子浓度则出现菌落过度密集,不利于单克隆计数和筛选。因此,ATMT体系中较高的转化子数量并不是唯一的优化目标,还需要兼顾转化子之间的可分离性和后续筛选操作[40]。

共培养温度和时间则同时影响农杆菌的T-DNA转移过程以及受体孢子的萌发和菌丝生长。已有研究表明,高温条件下Vir蛋白表达水平会下降,从而抑制T-DNA转移过程,而低温条件会影响受体真菌的萌发和生长状态[41]。本研究发现在20～30 ℃范围内,25 ℃时的转化效率较高,温度继续升高后转化子数量下降。共培养时间方面,随着

培养时间由24 h延长，转化子数量逐渐增加，说明充分的供受体接触时间有利于T-DNA转移；但培养时间过长时，真菌菌丝大量生长并造成菌落相互连接，反而增加后续单克隆分离的难度。因此，本研究最终选择25 ℃共培养48 h，是在转化效率与后续转化子分离可操作性之间取得平衡的结果。

除转化效率外，转化子的遗传稳定性也是评价遗传转化体系可靠性的重要指标。本研究随机选取的转化子均可扩增获得预期目的片段，同时针对农杆菌16S rDNA的检测未发现残留农杆菌，表明经复筛后获得的阳性菌株并非由于农杆菌残留造成的假阳性。转化株在无选择压力条件下连续传代5代后仍能够在含潮霉素B的培养基上稳定生长，说明导入的遗传元件能够在草酸青霉SG-4中保持较好的遗传稳定性。上述结果说明，本研究建立的ATMT体系不仅能够获得较多转化子，而且能够获得经过分离纯化后稳定遗传的阳性转化株，为进一步开展目的基因功能研究提供了可靠的技术基础。

本研究进一步利用所建立的ATMT体系对三峡肽素候选生物合成基因簇中的*PDE_01064*、*PDE_01069*、*PDE_01071*和*PDE_01073*进行了RNA干扰，从而对该体系在实际功能基因研究中的适用性进行了验证。与野生型SG-4菌株的三峡肽素产量23.29 μg/mL相比，*PDE_01064*、*PDE_01069*、*PDE_01071*和*PDE_01073*各组干扰株的平均产量分别降至6.64、2.83、5.38和2.61 μg/mL，表明4个基因受到干扰后均使三峡肽素产量下降，说明所构建的ATMT体系能够满足草酸青霉SG-4目的基因功能分析的需要。同时，从遗传学角度支持上述基因参与三峡肽素生物合成，也进一步支持该候选基因簇与三峡肽素形成相关。

4 结 论

综上所述，本研究构建并优化了草酸青霉的ATMT转化体系。较适宜的转化条件为：农杆菌经200 μmol/L AS预诱导后，稀释至OD_{600}=0.6～0.8，与浓度为1×10^6孢子/mL的孢子悬液等体积混合，在含200 μmol/L AS的IM培养基上25 ℃共培养48 h。在该条件下获得的转化子经PCR验证均为阳性，并具有良好的遗传稳定性。进一步利用该体系获得三峡肽素候选生物合成基因簇中*PDE_01064*、*PDE_01069*、*PDE_01071*和*PDE_01073*的RNA干扰株，各干扰株均表现出三峡肽素产量显著下降，证明了上述基因参与三峡肽素生物合成。研究结果表明，该ATMT体系可作为草酸青霉SG-4遗传操作和次级代谢相关基因功能研究的技术平台，并支持NRPS基因*PDE_01071*所在的基因簇参与了三峡肽素的生物合成。

参考文献

[1] Zhang J, Yu H L, Zhang Y, et al. Antimicrobial and antitumor activities of endophytic fungi from the medicinal plant *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*[J]. Current Microbiology, 2026, 83(6): 329.

[2] Tong J H, Wu H X, Jiang X H, et al. Dual regulatory role of *Penicillium oxalicum* SL2 in soil: phosphorus solubilization and Pb stabilization[J]. Environmental Science & Technology, 2024, 58(1): 603-616.

[3] Verma A, Singh S, Gupta P, et al. Phytosphingosine, a sphingolipid isolated from fungal endophyte *Penicillium oxalicum*, exerts cytotoxic effects against breast cancer cells and shows blood compatibility[J]. Scientific Reports, 2025, 15: 36622.

[4] Zhong L Y, Jin F C, Qin L Y, et al. Optimization of fermentation conditions for cellulase/xylanase production and hydrolysis conditions for efficient conversion of agricultural residues using *Penicillium oxalicum* UNN1[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2026, 13(1): 39.

[5] Keller N P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(3): 167-180.

[6] Yuan Y J, Cheng S, Bian G K, et al. Efficient exploration of terpenoid biosynthetic gene clusters in filamentous fungi[J]. Nature Catalysis, 2022, 5(4): 277-287.

[7] Deng Q S, Li Y C, He W Y, et al. A polyene macrolide targeting phospholipids in the fungal cell membrane[J]. Nature, 2025, 640(8059): 743-751.

[8] Xu M Y, Ren Y J, Yang X T, et al. Unraveling the metabolic regulation of *Eleutherococcus senticosus* leaves by *Penicillium oxalicum*: insights from targeted and non-targeted metabolomics[J]. BMC Plant Biology, 2026, 26(1): 1000.

[9] 杨康敏，高向东，顾觉奋. 激活沉默基因簇发掘微生物次级代谢产物的研究进展[J]. 中国医药生物技术，2015, 10(1): 77-80.
Yang K M, Gao X D, Gu J F. Recent advances in activating silent biosynthetic gene clusters to discover novel secondary metabolites[J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2015, 10(1): 77-80.

[10] Udwary D W, Otani H, Mouncey N J. New keys to unlock the treasure trove of microbial natural products[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(11): 683.

[11] Chen Y Y, Cai C L, Yang J F, et al. Development of the CRISPR-Cas9 system for the marine-derived fungi

Spiromastix sp. SCSIO F190 and *Aspergillus* sp. SCSIO SX7S7[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(7): 715.

[12] Li C, Zhou J W, Du G C, et al. Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production [J]. Biotechnology Advances, 2020, 44: 107630.

[13] 赵美, 王陈骄子, 周而勋, 等. 丝状真菌遗传转化系统的最新研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(3): 1138-1143.
Zhao M, Wang C J Z, Zhou E X, et al. The latest research progress on genetic transformation system of filamentous fungi [J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(3): 1138-1143.

[14] Li D D, Tang Y, Lin J, et al. Methods for genetic transformation of filamentous fungi[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 168.

[15] 蒋艺, 苏宁, 方诩. 木质纤维素降解酶生产菌株的遗传改造及应用[J]. 微生物学报, 2017, 57(8): 1235-1248.
Jiang Y, Su N, Fang X. Genetic modification and application of lignocellulose degrading fungus[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(8): 1235-1248.

[16] Thompson M G, Moore W M, Hummel N F C, et al. *Agrobacterium tumefaciens*: a bacterium primed for synthetic biology [J]. BioDesign Research, 2020, 2020: 8189219.

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

[18] Michielse C B, Hooykaas P JJ, van den Hondel C A M J J, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*[J]. Nature Protocols, 2008, 3(10): 1671-1678.

[19] Szarzanowicz M J, Waldburger L M, Busche M, et al. Binary vector copy number engineering improves *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Nature Biotechnology, 2025, 43(10): 1708-1716.

[20] Ropero-Pérez C, Manzanares P, Marcos J F, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for the genetic modification of the biotechnologically relevant fungus *Aspergillus vadensis* through synthetic biology[J]. Current Research in Biotechnology, 2024, 7: 100178.

[21] Dong Y H, Wang S T. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method for *Fusarium oxysporum* [J]. Methods in Molecular Biology, 2022, 2391: 63-73.

[22] Sørensen L Q, Lysøe E, Larsen J E, et al. Genetic transformation of *Fusarium avenaceum* by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and the development of a USER-Brick vector construction system[J]. BMC Molecular Biology, 2014, 15(1): 15.

[23] Vu T X, Ngo T T, Mai L T D, et al. A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using DsRed and GFP to visualize *Citrus host* colonization [J]. Journal of Microbiological Methods, 2018, 144: 134-144.

[24] Tran V T, Thai H D, Vu T X, et al. An efficient *Agrobacterium*-mediated system based on the *pyrG* auxotrophic marker for recombinant expression in the filamentous fungus *Penicillium rubens*[J]. Biotechnology Letters, 2023, 45(5): 689-702.

[25] 孟晓琳, 庞锡明, 王洁. 农杆菌介导海洋草酸青霉转化体系及聚酮合酶PKS生物学功能[J]. 中国生物工程杂志, 2020, 40(9): 11-17.
Meng X L, Pang X M, Wang J. *Agrobacterium*-mediated transformation and the functions of PKS in marine-derived *Penicillium oxalicum* [J]. China Biotechnology, 2020, 40(9): 11-17.

[26] 晏露闻, 邱鹏磊, 刘晓静, 等. 根癌农杆菌介导虎杖象甲培植梅花状青霉*Penicillium herquei*转化体系的构建[J]. 菌物学报, 2026, 45(8): 129-141.
Yan L W, Qiu P L, Liu X J, et al. Establishment of an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for *Penicillium herquei* cultivated by attelabid weevils[J]. Mycosystema, 2026, 45(8): 129-141.

[27] de Boer P, Bronkhof J, Dukić K, et al. Efficient gene targeting in *Penicillium chrysogenum* using novel *Agrobacterium*-mediated transformation approaches [J]. Fungal Genetics and Biology, 2013, 61: 9-14.

[28] 张极峰, 白晓轩, 刘超, 等. 产三峡肽素的草酸青霉SG-4的全基因组测序[J]. 生物学杂志, 2024, 41(5): 20-25.
Zhang J F, Bai X X, Liu C, et al. Whole genome sequencing of *Penicillium oxalicum* SG-4 producing Sanxiapeptin [J]. Journal of Biology, 2024, 41(5): 20-25.

[29] 刘超, 李坤, 白晓轩, 等. 利用转录组学分析三峡肽素生物合成的基因簇[J]. 食品工业科技, 2021, 42(13): 156-162.
Liu C, Li K, Bai X X, et al. Analysis of gene clusters for Sanxiapeptin biosynthesis by transcriptomic sequencing [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(13): 156-162.

[30] 刘超, 宋瑾怡, 薛艳红, 等. 草酸青霉线性五肽生物合成的比较转录组分析[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(5): 37-44.

Liu C, Song J Y, Xue Y H, et al. Comparative transcriptome analysis of linear pentapeptide biosynthesis in *Penicillium oxalicum*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(5): 37-44.

[31] Li J, Bai X X, Zhu G J, et al. Sanxiapeptin is an ideal preservative with a dual effect of controlling green mold and inducing systemic defense in postharvest *Citrus*[J]. Food Chemistry, 2024, 453: 139669.

[32] Bai X X, Li J, Xiong R Q, et al. Sanxiapeptin inhibits *Penicillium digitatum* by affecting cell surface and ROS accumulation[J]. Postharvest Biology and Technology, 2026, 234: 114108.

[33] Agrawal S, Rami E. A review: *Agrobacterium*-mediated gene transformation to increase plant productivity [J]. The Journal of Phytopharmacology, 2022, 11(2): 111-117.

[34] Sunday G, Nwaneri G, Ugwu C M, et al. *Agrobacterium tumefaciens*: biology and application in genetic engineering[J]. GSC Advanced Research and Reviews, 2024, 20(1): 389-398.

[35] 胡懋, 曾杨璇, 苗华彪, 等. 根癌农杆菌介导真菌遗传转化的研究及应用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4344-4363.
Hu M, Zeng Y X, Miao H B, et al. Research and application of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated fungal genetic transformation[J]. Microbiology China, 2021, 48(11): 4344-4363.

[36] Sharma K K, Kuhad R C. Genetic transformation of lignin degrading fungi facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. BMC Biotechnology, 2010, 10(1): 67.

[37] Kemppainen M, Circosta A, Tagu D, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor* S238N [J]. Mycorrhiza, 2005, 16(1): 19-22.

[38] Joubert P, Beaupère D, Lelièvre P, et al. Effects of phenolic compounds on *Agrobacterium vir* genes and gene transfer induction: a plausible molecular mechanism of phenol binding protein activation [J]. Plant Science, 2002, 162(5): 733-743.

[39] Winans S C. Transcriptional induction of an *Agrobacterium* regulatory gene at tandem promoters by plant-released phenolic compounds, phosphate starvation, and acidic growth media[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(5): 2433-2438.

[40] 李娟, 邱睿, 张盈盈, 等. 根癌农杆菌介导的尖孢镰刀菌遗传转化体系构建[J]. 中国烟草学报, 2022, 28(4): 106-113.
Li J, Qiu R, Zhang Y Y, et al. Construction of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation system of tobacco *Fusarium oxysporum*[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2022, 28(4): 106-113.

[41] Fullner K J, Lara J C, Nester E W. *Pilus* assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes [J]. Science, 1996, 273(5278): 1107-1109.