

## 运用萎锈灵抗性基因构建香菇聚乙二醇介导的遗传转化方法

鲍大鹏 杨瑞恒 王莹 茅文俊 汪滢 李燕\*

(国家食用菌工程技术研究中心 农业部南方食用菌资源利用专业重点实验室 上海市农业科学院食用菌研究所  
上海 201403)

**摘要:**【背景】萎锈灵抗性基因作为筛选标记在植物和真菌中得到广泛应用。【目的】构建可以使用萎锈灵作为筛选标记的香菇遗传转化技术。【方法】利用溶壁酶消化培养4 d的香菇菌株411-4的菌丝体获得原生质体,加入适量pL-cbx质粒和聚乙二醇溶液,混合物涂布于再生筛选培养基上,培养后挑选菌落进行验证试验。【结果】在原生质体数目 $>10^8$ 个和添加4  $\mu$ g质粒DNA的情况下,得到了40个抗性转化子。利用PCR实验和转代实验对转化子进行验证,结果显示38个转化子的抗性可稳定遗传,表明萎锈灵抗性基因整合进入了供试菌株的基因组中。【结论】利用香菇411-4菌株建立了一套运用萎锈灵抗性基因作为分子标记的遗传转化技术体系。

**关键词:** 香菇, 聚乙二醇介导的原生质体转化, 萎锈灵

## PEG-mediated genetic transformation of *Lentinula edodes* by using carboxin resistant gene as selective marker

BAO Da-Peng YANG Rui-Heng WANG Ying MAO Wen-Jun WANG Ying LI Yan\*

(National Engineering Research Center of Edible Fungi, Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

**Abstract:** [Background] As a selective marker, carboxin has been used in plant and fungi transformation. [Objective] To construct the genetic transformation system of *Lentinula edodes* by using carboxin resistant gene as a selective marker. [Methods] The mycelia of *L. edodes* strain 411-4 were collected at the 4<sup>th</sup> day after cultivation and then digested by lywallzyme to obtain the protoplast. Sufficient protoplast was mixed with the plasmid pL-cbx DNA and the polyethylene glycol (PEG) solution for transformation. The mixture finally was spread on the regeneration selecting plate, and the generated colonies were picked up for further testing. [Results] When more than  $10^8$  protoplasts and 4  $\mu$ g plasmid DNA were used, 40 transformants were obtained. After being subcultured on media under carboxin selective stress, and the PCR identification, 38 transformants were positive and stable, indicating that carboxin gene was integrated into the genome of *L. edodes*

**Foundation item:** Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (G2015060201)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-37196812; E-mail: swallow2005@live.cn

**Received:** October 23, 2017; **Accepted:** January 17, 2018; **Published online** (www.cnki.net): February 11, 2018  
基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(G2015060201)

\*通信作者: Tel: 86-21-37196812; E-mail: swallow2005@live.cn

收稿日期: 2017-10-23; 接受日期: 2018-01-17; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-02-11

411-4. [Conclusion] The PEG mediated transformation method was constructed by using *L. edodes* strain 411-4 and carboxin selective marker.

**Keywords:** *Lentinula edodes*, PEG mediated protoplast transformation, Carboxin

在真菌的遗传转化研究中,通常会利用抗性分子标记来提高筛选转化子的工作效率,常用的抗性分子标记包括抗生素、药物或除草剂抗性基因。萎锈灵抗性基因是近年来被发现的一种基于自身基因发生点突变而产生的分子标记,在植物和真菌的遗传转化中具有广泛的应用,而在食用真菌研究中应用较少。萎锈灵是一种具有内吸作用的杂环类杀菌剂,可以通过抑制三羧酸循环中的琥珀酸脱氢酶(EC 1.3.99.1)活性,影响病原菌线粒体的呼吸链电子传递系统,阻碍能量代谢,抑制病原菌的生长,导致其死亡<sup>[1]</sup>。

在对玉米瘤黑粉病菌(*Ustilago maydis*)的研究中首次发现了萎锈灵抗性突变株,该突变株的琥珀酸脱氢酶仅是第 267 位的组氨酸突变为酪氨酸<sup>[2-3]</sup>,这个点突变不影响琥珀酸脱氢酶的活性,但却使菌株获得了对萎锈灵的抗性。Honda 等首次将萎锈灵抗性作为分子标记运用于糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)的遗传转化体系构建中,随后在灰盖鬼伞(*Coprinopsis cinerea*)、香菇(*Lentinula edodes*)等物种的遗传转化中均有应用报道<sup>[4-6]</sup>。

目前,食用真菌遗传转化技术主要有聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)转化法、电穿孔法、农杆菌介导法和基因枪法等。电穿孔和基因枪介导的转化其优点在于可以快速高效地导入外源基因,缺点是对仪器设备的依赖性强<sup>[7-8]</sup>;农杆菌介导的转化法其优点在于成功率高、方法成熟、可在后代中稳定遗传,缺点是农杆菌的宿主主要是双子叶植物,对真菌侵染的效果具有物种特异性,限制了该技术的适用范围<sup>[9]</sup>;PEG 介导的遗传转化具有成本低廉、结果稳定、不需要特殊仪器设备的优点,虽然缺点是需要使用原生质体为材料,但 PEG 转化法仍然是食用真菌遗传转化实验的重要手段<sup>[10-12]</sup>。

在食用真菌 PEG 应用实践中发现,影响转化效率的因素有很多,如菌株、细胞壁降解酶、PEG 处

理参数等。香菇是我国广泛栽培的主要食用菌之一,开展香菇遗传转化研究具有重要的理论意义和实践价值。本研究运用 PEG 方法,将萎锈灵抗性基因转入一株香菇尿嘧啶营养缺陷型菌株中,并获得了较高的转化效率,建立了一套简单有效的转化方法,有利于进一步促进香菇遗传操作研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

供试香菇菌株为单核体 411-4,它是尿嘧啶营养缺陷型(*pyrG<sup>-</sup>*),由上海市农业科学院食用菌研究所菌种保藏中心保藏并提供。实验所用质粒 pL-cbx 由京都大学本田与一教授惠赠,该质粒含有在原核生物中的筛选标记  $Amp^r$  和在真核生物中的筛选标记  $Cbx^r$ 。

### 1.2 培养基及主要试剂和仪器

加富酵母麦芽糖葡萄糖培养基(YMGUU):酵母 4.0 g/L,麦芽糖 10 g/L,葡萄糖 4.0 g/L,尿嘧啶 0.18 mmol/L,尿苷 20 mmol/L,固体培养菌丝时加入琼脂 15 g/L。香菇 411-4 菌丝的培养使用 YMGUU 培养基,液体 YMGUU 中不加入琼脂;溶壁酶(Lywallzyme)来自广东省微生物研究所;再生培养基是在 YMGUU 培养基上分别加入 0.5 mol/L 蔗糖作为渗透压稳定剂,再生筛选培养基是在 YMGUU 培养基中加入 0.5 mol/L 蔗糖后再加入合适浓度的萎锈灵,检测培养基是在 YMGUU 培养基中加入合适浓度的萎锈灵。

STC 溶液:0.6 mol/L 山梨醇,0.5 mol/L 蔗糖,10 mmol/L Tris,10 mmol/L  $CaCl_2$ ,pH 6.5;PTC 溶液:20% PEG-4000,10 mmol/L Tris,10 mmol/L  $CaCl_2$ ,0.5 mol/L 蔗糖。DNA 提取和转化实验所需试剂均购自国药(上海)公司;EmeraldAmp<sup>®</sup> MAX PCR Master Mix 购自 TaKaRa 公司。PCR 仪购自 Bio-Rad 公司。

### 1.3 供试菌株抗药性测定

YMGUU 培养基中添加萎锈灵(浓度分别为 0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L),接种供试菌株 411-4, 25 °C 培养 1 周,观察菌丝生长情况。

### 1.4 供试菌株原生质体的制备

香菇原生质体的制备参考文献[13]报道方法,具体的操作过程是:首先接种 8–10 个直径 8 mm 的接种块至 YMGUU 液体培养基,28 °C、120 r/min 摇床培养 4 d。培养好的菌丝继续放入匀质仪低速破碎,每次 7 s,共 4 次,破碎后的菌丝继续在原培养条件下培养 4 h。收集菌丝,洗净后加入 5 mL 浓度为 1.5%的溶壁酶,31 °C 振荡酶解 3 h 后,使用 2 层无纺布过滤收集原生质体,使用 0.5 mol/L 蔗糖洗涤 2 次,1 258×g 离心 5 min,加入 1 mL STC 溶液洗涤 1 次,最后原生质体沉淀中加入 0.2 mL STC 溶液。

### 1.5 PEG 介导的香菇原生质体转化

质粒 pL-cbx 的提取方法按照分子克隆实验的方法进行操作<sup>[14]</sup>。取上述 0.2 mL 原生质体悬浮液中加入适量 pL-cbx 质粒后,置冰上 40 min;然后加入 1 mL PTC 溶液,室温放置 20 min;最后,涂布上述混合物 300 μL 于含有萎锈灵的再生筛选培养基平板中,于 25 °C 培养 2 周。对照中不加质粒载体,其他操作相同。

### 1.6 转化子挑取和 PCR 验证

待再生筛选平板上菌落长出,挑取单菌落至含有萎锈灵的检测平板上,能继续生长的菌落用于下

一步的分子检测和菌丝生长速度实验。香菇基因组 DNA 的提取依照张红等<sup>[15]</sup>介绍的方法进行。以上述方法提取的香菇 DNA 作为模板,扩增 Cbx 和 ITS 基因片段作为分子标记。引物分别为 Cbx-F (5'-AGCATCGCAAGTGAAACCGAGC-3')和 Cbx-R (5'-CCGATGACACTGCCAACGACTA-3')以及 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。使用 10 μL 的反应体系进行 PCR 扩增:EmeraldAmp<sup>®</sup> MAX PCR Master Mix 5 μL, DNA 模板 100 ng,上、下游引物各 2 μmol/L。PCR 反应条件:95 °C 5 min; 96 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s,共 30 个循环; 72 °C 5 min。采用 1%琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像系统观察目的基因的扩增情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 香菇 411-4 菌株的萎锈灵抗药性分析

香菇 411-4 接种在萎锈灵浓度为 0.1–1.0 mg/L 的平板上均可生长,但生长速度受到一定影响;在 2 mg/L 以上浓度的平板上不能生长(图 1),因此选取 2 mg/L 的浓度作萎锈灵抗性筛选浓度。

### 2.2 香菇原生质体的制备结果

利用溶壁酶对香菇 411-4 培养 4 d 的菌丝(约 2 g)进行酶解,离心洗涤后,可获得原生质体悬浮液,经显微镜观察并计数,数目达到 10<sup>8</sup> 个/mL 以上,满足转化实验的需要。

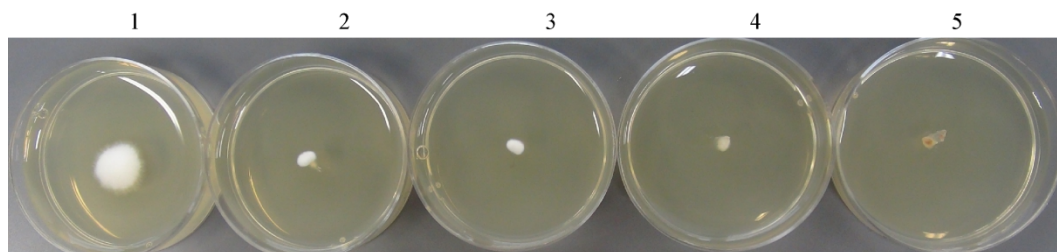


图 1 香菇菌株 411-4 的萎锈灵抗药性试验

Figure 1 Drug resistance on carboxin of *L. edodes* 411-4

注:1–5:萎锈灵浓度分别为 0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L。

Note: 1–5: 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L carboxin concentration.

### 2.3 PEG 介导的原生质体转化实验

供试菌株的原生质体悬浮液和 4  $\mu$ g 质粒 DNA 混合处理后, 在含有萎锈灵再生筛选平板上共长出 40 个单菌落, 对照平板上无菌落生长。挑取单菌落接种至检测培养基上培养后, 提取菌丝 DNA 为模板, 以 Cbx 和 ITS 基因作为分子标记进行扩增, 结果表明, 40 个单菌落中仅有 2 个假阳性, 其余均为阳性菌落(图 2)。阳性菌落经 3 次传代纯化培养后, 依然可以在有抗性的培养基上生长, 说明该抗性基因已经整合进入香菇 411-4 菌株的基因组, 可以稳定遗传给后代; 另一方面, 就生长速度而言, 野生型菌株与转化子在菌落形态上无明显区别, 说明质粒载体的插入没有对香菇菌株的生长造成严重影响(图 3)。

### 3 讨论与结论

在食用真菌的遗传转化中, 目前常用的抗药性标记是潮霉素(Hyg<sup>r</sup>)抗性基因, 而对萎锈灵(Cbx<sup>r</sup>)抗

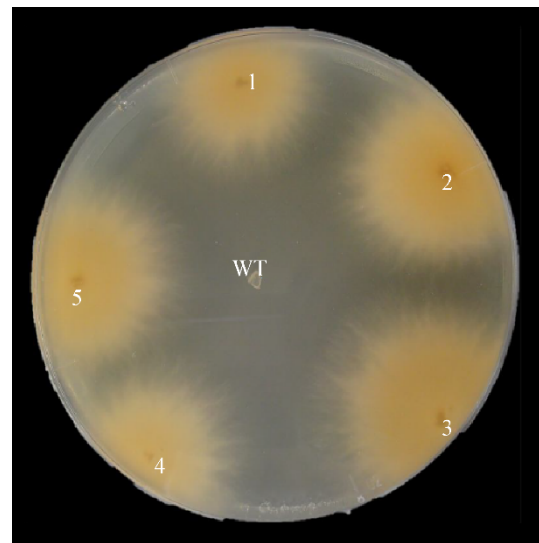


图 3 香菇菌株 411-4 野生型和转化子在萎锈灵抗性平板上的生长情况

Figure 3 The phenotypic analysis of wild type and transformants of *L. edodes* 411-4

Note: WT: Wild type; 1-5: Transformants.

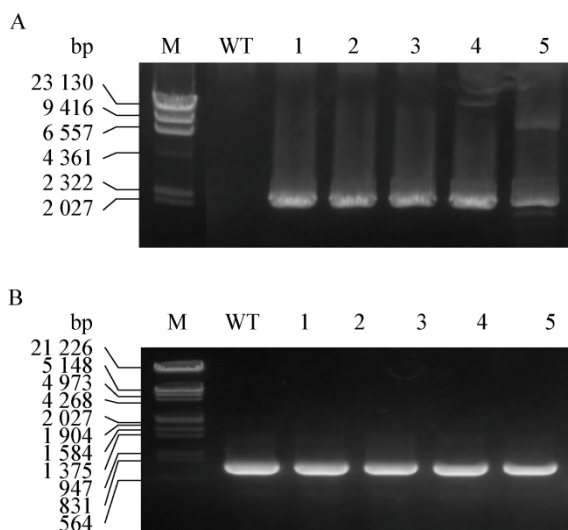


图 2 香菇菌株 411-4 的部分萎锈灵抗性转化子的 PCR 验证结果

Figure 2 PCR analysis of DNA isolated from putative carboxin-resistant transformants of *L. edodes* 411-4

注: A: Cbx 基因扩增产物, 大小约 2 000 bp; B: ITS 区域扩增产物, 大小约 700 bp.

Note: A: PCR products of Cbx gene about 2 000 bp; B: PCR products of ITS region about 700 bp.

性基因的研究较少。在使用潮霉素抗性基因为分子标记的食用真菌遗传转化实验中, 常会出现较多假阳性和遗传性能不稳定的转化子, 需要进行大量的筛选工作, 降低了工作效率。本研究通过以 pL-cbx 质粒为载体转化香菇 411-4 菌株, 每微克质粒 DNA 得到 10 个转化子, 转化率相对较高, 而且经 PCR 验证大量转化子为阳性转化子(阳性比例为 38/40)。香菇遗传转化中供试菌株是影响转化效率的一个重要因素, 在日本学者的相关研究中, 常用香菇供试菌株为 XR-1<sup>[16-17]</sup>。本研究选用了一株本实验室常用的香菇尿嘧啶营养缺陷型菌株 411-4 作为供试菌株, 获得了较好的转化效率, 建立了以萎锈灵为筛选标记的香菇遗传转化体系, 为进一步开展香菇分子遗传学研究提供了技术手段。

### REFERENCES

- [1] Ragsdale NN, Sisler HD. Metabolic effects related to fungitoxicity of carboxin[J]. Phytopathology, 1970, 60(10): 1422-1427
- [2] Keon JPR, White GA, Hargreaves JA. Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago*

- maydis*[J]. Current Genetics, 1991, 19(6): 475-481
- [3] Broomfield PLE, Hargreaves JA. A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*[J]. Current Genetics, 1992, 22(2): 117-121
- [4] Honda Y, Matsuyama T, Irie T, et al. Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*[J]. Current Genetics, 2000, 37(3): 209-212
- [5] Ito Y, Muraguchi H, Seshime Y, et al. Flutolanil and carboxin resistance in *Coprinus cinereus* conferred by a mutation in the cytochrome  $b_{560}$  subunit of succinate dehydrogenase complex (Complex II)[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 272(3): 328-335
- [6] Irie T, Sato T, Saito K, et al. Construction of a homologous selectable marker gene for *Lentinula edodes* transformation[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(9): 2006-2009
- [7] Sunagawa M, Murata H, Miyazaki Y, et al. Transformation of the mycorrhizal basidiomycetes, *Suillus grevillei* and *S. bovinus*, by particle bombardment[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(1): 47-50
- [8] Gutiérrez A, López-García S, Garre V. High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 84(3): 442-446
- [9] Michielse CB, Hooykaas PJ, van den Hondel CAMJJ, et al. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. Current Genetics, 2005, 48(1): 1-17
- [10] Chen X, Stone M, Schlagnhauer C, et al. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4510-4513
- [11] Wang J, Guo LQ, Zhang K, et al. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Volvariella volvacea*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(17): 8524-8527
- [12] Sharon A. Molecular and Cell Biology Methods for Fungi[M]. Totowa, NJ: Humana Press, 2010: 3-20
- [13] Nakazawa T, Tatsuta Y, Fujita T, et al. Mutations in the *Cc.rmt1* gene encoding a putative protein arginine methyltransferase alter developmental programs in the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*[J]. Current Genetics, 2010, 56(4): 361-367
- [14] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1-999
- [15] Zhang H, Qin LH, Tan Q, et al. Extract genomic DNA from *Lentinula edodes* using CTAB method[J]. Journal of Shanghai University (Natural Science), 2006, 12(5): 547-550 (in Chinese)  
张红, 秦莲花, 谭琦, 等. 用改进的 CTAB 法提取香菇基因组 DNA[J]. 上海大学学报: 自然科学版, 2006, 12(5): 547-550
- [16] Hiyama R, Gisusi S, Harada A. Effect of increased harvests on saccharification ratio of waste mushroom medium from the cultivation of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*)[J]. Journal of Wood Science, 2013, 59(1): 88-93
- [17] Hiyama R, Gisusi S, Harada A. Evaluation of waste mushroom medium from cultivation of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) as feedstock of enzymic saccharification[J]. Journal of Wood Science, 2011, 57(5): 429-435