

农杆菌介导的斑玉蕈遗传转化

孙运奇^{1,2} 陈辉² 张津京^{1,2} 陈明杰² 冯志勇^{1,2*} 汪虹²

(1. 南京农业大学 生命科学学院 江苏 南京 210095)

(2. 上海市农业科学院食用菌研究所 农业部南方食用菌资源利用重点实验室 国家食用菌工程技术研究中心
国家食用菌加工技术研发分中心 上海市农业遗传育种重点开放实验室 上海 201403)

摘要:【目的】将农杆菌介导的转化应用于重要的工厂化栽培食用菌斑玉蕈中, 建立稳定的农杆菌介导的斑玉蕈遗传转化技术。【方法】将构建的双元载体 pYN6982 转入农杆菌 LBA4404 菌株中, 以斑玉蕈 SIEF3133 菌株打碎的双核菌丝为受体材料, 利用根癌农杆菌介导的转化方法进行斑玉蕈转化试验。【结果】经潮霉素抗性筛选、PCR 鉴定以及有丝分裂稳定性试验验证, 表明潮霉素磷酸转移酶基因(*hph*)已经整合到斑玉蕈的基因组中; 转基因斑玉蕈菌丝在荧光显微镜下可以观测到绿色荧光, 表明增强型绿色荧光蛋白基因(*egfp*)已经在转基因斑玉蕈菌株中获得了表达; 通过 PCR 检测, 随机挑选的 8 个转基因斑玉蕈菌株中有 2 个可以扩增出载体转移 DNA (T-DNA)边界重复序列外的卡那霉素基因(*kan*)序列。【结论】获得了稳定遗传和表达的斑玉蕈转基因菌株, 建立了农杆菌介导的斑玉蕈遗传转化方法。农杆菌介导的斑玉蕈遗传转化中, 存在载体 T-DNA 边界重复序列之外的 DNA 序列转移到转基因斑玉蕈中的现象, 有待进一步研究。

关键词: 斑玉蕈, 农杆菌, EGFP, 遗传转化

Agrobacterium-mediated transformation in *Hypsizygus marmoreus*

SUN Yun-Qi^{1,2} CHEN Hui² ZHANG Jin-Jing^{1,2} CHEN Ming-Jie²
FENG Zhi-Yong^{1,2*} WANG Hong²

(1. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

(2. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, China, National Engineering Research Center of Edible Fungi, National R&D Center for Edible Fungi Processing, Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai, Shanghai 201403, China)

Abstract: [Objective] Using *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool, we built a stable genetic transformation of *Hypsizygus marmoreus*. [Methods] After binary expression vector pYN6982 was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, we transformed *H. marmoreus* SIEF3133 blended vegetative dikaryotic mycelia via *Agrobacterium*-mediated transformation. [Results] Dozens of transgenic strains of *H. marmoreus* with genetic stability were obtained after hygromycin resistance selection, PCR identification and mitotic stability test. By

基金项目: 上海市科委重点科技攻关项目(No. 11391901003)

*通讯作者: 信箱: feng_zy@yahoo.com

收稿日期: 2013-11-17; 接受日期: 2013-12-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-02

fluorescence microscopy analysis of randomly selected transformants, green fluorescence can be observed. This enhanced green fluorescent protein gene (*egfp*) has expressed in transgenic *H. marmoreus*. Moreover, two of eight randomly selected *H. marmoreus* transformants contain kanamycin gene (*kan*) sequences from outside the transferred DNA (T-DNA) border repeats using PCR analysis. **[Conclusion]** Transgenic strains of *H. marmoreus* with genetic stability and *egfp* expression were obtained. Also, DNA sequences from beyond the classically defined T-DNA border direct repeats can be transferred into the *H. marmoreus* mycelia. This phenomenon requires attention in *H. marmoreus* functional gene study.

Keywords: *Hypsizygus marmoreus*, *Agrobacterium tumefaciens*, EGFP, Genetic transformation

斑玉蕈(*Hypsizygus marmoreus*)又名玉蕈、真姬菇等,在分类地位上隶属于担子菌门,层菌纲,伞菌目,白蘑科,玉蕈属。斑玉蕈是一种质地脆嫩,味道鲜美,营养丰富,具有多种保健功效的重要食用菌,同时也是我国已经实现周年化、工厂化生产的主要食用菌之一。

食用菌基因工程研究起步较晚,没有一个稳定、高效的外源基因转化系统是制约利用分子生物学方法进行食用菌遗传改造的主要障碍^[1]。随着基因工程技术的不断发展和成熟,科研人员开始致力于食用菌的遗传转化研究。但传统的遗传转化方法[聚乙二醇(PEG)介导法^[2]、电击法^[3]、基因枪法^[4]、限制酶介导整合法^[5]等]由于操作复杂、设备昂贵和转化效率低等原因,限制了这些方法在食用菌功能基因研究中的应用^[6]。近年来,根癌农杆菌介导的转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)技术在双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)、草菇(*Volvariella volvacea*)和糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)等食用菌转化中进行了一些尝试,取得了一些成果^[7-9]。另外,ATMT技术在众多丝状真菌中的成功运用^[1],也鼓舞人们在斑玉蕈等食用菌的转化研究中对ATMT技术开展更多的探索。ATMT技术作为食用菌分子遗传学研究的重要方法和工具之一,在食用菌定向分子育种、基因功能研究以及外源蛋白表达等方面均具有一定的科研和应用价值。

本研究利用含有与斑玉蕈近缘的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GPD)启动子的双元载体 pYN6982 (图

1),以潮霉素(Hyg)作为筛选标记,增强型绿色荧光蛋白(*egfp*)基因作为报告基因,将ATMT技术成功应用于重要的工厂化栽培食用菌斑玉蕈的转化研究中,并对获得的转基因斑玉蕈菌株中EGFP的表达情况及转移DNA(T-DNA)的整合情况进行相关探究,以期能够建立稳定的斑玉蕈菌丝的ATMT转化方法,获得稳定遗传的转基因斑玉蕈菌株,为斑玉蕈基因功能和定向育种研究奠定基础,并为其其他食用菌的转化研究提供有益借鉴。

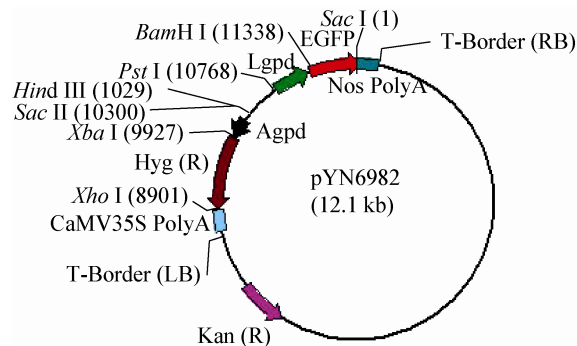


图1 双元载体 pYN6982 图谱

Figure 1 Map of binary vector pYN6982

注: Hyg(R): 潮霉素抗性基因; EGFP: 增强型绿色荧光蛋白; Agpd 和 Lgpd: 双孢蘑菇和香菇 GPD 启动子; LB 和 RB: 农杆菌 T-DNA 的左边界和右边界; Kan(R): 卡那霉素抗性基因。Note: Hyg(R): Hygromycin resistance gene; EGFP: Enhanced green fluorescent protein; Agpd and Lgpd: *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter; LB and RB: Left border and Right border sequences of *Agrobacterium* T-DNA; Kan(R): Kanamycin resistance gene.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 斑玉蕈 SIEF3133 双核菌株由

中国微生物菌种保藏管理委员会农业微生物中心上海食用菌分中心提供; 大肠杆菌 Top10、农杆菌 LBA4404 菌株购自上海迈其生物科技有限公司; 质粒载体 pYN6982 由本实验室构建。

1.1.2 酶和化学试剂: 本研究所用的限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、凝胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司; DNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成; 卡那霉素(Kan)、利福平(Rif)、头孢噻肟钠(Cef)、乙酰丁香酮(As)等购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 潮霉素(Hyg)购自 Roche 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 PCR 引物: 潮霉素抗性基因(Hph-F1: 5'-GTCGTGGCGATCCTGCAAGC-3'/Hph-R1: 5'-CCTGCGGGTAAATAGCTGCGC-3')和卡那霉素抗性基因(Kan-F: 5'-GGTCATGCATTCTAGGTACT-3'/Kan-R: 5'-AATGGCTAAAATGAGAATAT-3'), 由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.1.4 培养基: PDA 培养基^[6]、LB 培养基及共培养基^[7]。

1.2 方法

1.2.1 斑玉蕈表达载体转化农杆菌: 将双元载体 pYN6982 通过冻融法转化农杆菌 LBA4404 菌株后, 用 *hph* 基因的上下游引物 Hph-F1 和 Hph-R1 进行 PCR 扩增检测, 并用酶切作进一步确定, 经鉴定所得阳性农杆菌单菌落即为含载体 pYN6982 的农杆菌菌株。

1.2.2 农杆菌介导的斑玉蕈遗传转化: 农杆菌转化受体的制备: 将在固体 PDA 培养基上活化好的斑玉蕈 SIEF3133 双核菌丝带培养基挑入均质仪中, 加入 100 mL 液体 PDA 培养基, 高低速交替打碎 30 s 后, 液体分装到 3 瓶 100 mL 的液体 PDA 培养基中, 静置避光培养 3–5 d。将培养好的菌丝再次用均质仪打碎, 4 000×g 离心 10 min, 去上清, 沉淀用液体共培养基悬浮后待用。

斑玉蕈 SIEF3133 菌株对潮霉素的敏感性试验: 斑玉蕈 SIEF3133 双核菌株在 PDA 固体培养基上活化后, 用打孔器取直径约为 0.3 cm 大小的

菌块, 分别接种到含不同浓度潮霉素的 PDA 固体培养基中央。接种后置于 25 °C 恒温培养箱中培养 12 d 左右, 期间注意观察菌丝的生长情况, 每隔 2 d 用十字交叉法测量并记录菌落直径。同时, 将在 PDA 液体培养基中静置培养 4 d 的斑玉蕈 SIEF3133 用均质仪打碎后, 吸取 100 μL 菌液涂布于含不同浓度潮霉素的 PDA 固体培养基, 涂布后置于 25 °C 恒温培养箱中培养 10 d 左右, 期间注意观察菌丝的萌发情况。上述两种处理中, 潮霉素的浓度梯度依次都设置为 0、5、10、15、20、30 mg/L, 每个处理设置 3 个重复。

头孢噻肟钠对斑玉蕈菌丝的毒性试验: 斑玉蕈 SIEF3133 双核菌株在 PDA 固体培养基上活化后, 用打孔器取直径约为 0.3 cm 大小的菌块, 分别接种到含不同浓度头孢噻肟钠的 PDA 固体培养基中央。头孢噻肟钠的浓度梯度依次设置为 0、200、400、600、800 mg/L, 每个浓度梯度设置 3 个重复。接种后, 置于 25 °C 恒温培养箱中培养 10 d, 期间注意观察菌丝的生长情况。每隔 2 d 用十字交叉法测量并记录斑玉蕈菌落直径。

斑玉蕈转化过程: (1) 农杆菌 LBA4404 (含质粒 pYN6982) 在固体 LB 培养基(含 50 mg/L Rif 和 50 mg/L Kan)上划线培养, 28 °C 活化 2 d; (2) 挑取单菌落于 6 mL 左右液体 LB 培养基(含 50 mg/L Rif 和 50 mg/L Kan)中, 28 °C、150 r/min 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.5; (3) 3 000×g、4 °C 离心收集菌体, 沉淀洗涤后重悬于等体积液体共培养基中, 28 °C、100 r/min 振荡培养 4–6 h, 诱导农杆菌毒力的表达; (4) 将打碎的斑玉蕈菌丝与农杆菌菌液等体积混匀后, 涂布于表面铺有微孔滤膜的共培养基表面, 25 °C 避光共培养 2–3 d; (5) 将共培养基表面的微孔滤膜用镊子转移到 PDA 筛选培养基(含 Cef 400 mg/L 和 Hyg 20 mg/L)上, 25 °C 避光培养 15–20 d, 筛选转化子; (6) 将初筛培养基上能生长的拟转化子在 PCR 验证后转接到含 Cef 400 mg/L 和 Hyg 30 mg/L 的 PDA 抗性培养基上, 进行复筛。

1.2.3 斑玉蕈转化子的验证: 转化子的 PCR 检测: 取生长良好的 SIEF3133 拟转化子菌丝, 置于液氮中研成粉末, 用 CTAB 法提取拟转化子基因组 DNA 后, 取 1 μ L 总 DNA 为模板, 用 *hph* 基因的上下游引物 Hph-F1 和 Hph-R1 进行 PCR 扩增检测。

转化子的绿色荧光检测: 取在复筛培养基上生长良好的 SIEF3133 菌丝, 接种到 PDA 固体培养基上培养 6 d 后, 在菌落边缘的培养基中插入无菌盖玻片, 待菌丝爬片后, 取盖玻片在 Nikon eclipse TE2000-S 型荧光显微镜下观察 *egfp* 基因表达情况。

转化子的有丝分裂稳定性分析: 将随机挑选的 6 个转化子分别接种于无潮霉素选择压力的 PDA 固体培养基上培养 12 d, 然后用打孔器在转化子菌落边缘取直径约为 0.3 cm 的菌块转接到新的无选择压力的 PDA 固体培养基上培养, 上述继代培养过程共进行 5 次。再次将斑玉蕈转化子转入含 Hyg 20 mg/L 的 PDA 固体培养基上观察斑玉蕈生长情况。挑选能够正常生长的转化子, 提取转化子基因组 DNA, 用 *hph* 基因的上下游引物 Hph-F1 和 Hph-R1 进行 PCR 扩增检测。

斑玉蕈转化子中 *kan* 基因的 PCR 检测: 挑选能够正常生长的转化子, 提取转化子基因组 DNA, 用 *kan* 基因的上下游引物 Kan-F 和 Kan-R 进行 PCR 扩增检测。

1.2.4 斑玉蕈转化子的数量统计: 抗性菌落数(个/皿)=各筛选培养平板上抗性菌落总数/筛选培养平板总数。

2 结果与分析

2.1 表达载体转化农杆菌 LBA4404 菌株

将构建的表达载体 pYN6982 通过冻融法转化农杆菌 LBA4404 菌株后, 随机挑取 6 个农杆菌单菌落通过 PCR 扩增都得到 *hph* 基因片段(图 2), 证实 pYN6982 质粒已经导入 LBA4404 中。说明挑取的农杆菌可以用于下一步斑玉蕈的转化。

2.2 斑玉蕈 SIEF3133 菌株对潮霉素的敏感性试验

斑玉蕈 SIEF3133 菌株在潮霉素浓度为 10 mg/L 的 PDA 固体培养基上菌丝有微弱生长, 当潮霉素

浓度到达 20 mg/L 时, 菌丝生长受到强烈抑制, 不再生长(图 3), 说明斑玉蕈菌株 SIEF3133 菌丝对潮霉素十分敏感。同时, 打碎菌丝在含有 15 mg/L 潮霉素的 PDA 固体培养基上, 菌丝已经不能再生, 表明其生长同样受到潮霉素的强烈抑制。因此确定斑玉蕈 SIEF3133 的转化子在 PDA 固体培养基上的最佳潮霉素筛选浓度为 20 mg/L。

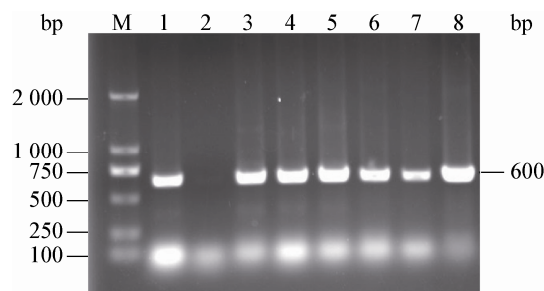


图 2 农杆菌转化子的菌落 PCR 鉴定

Figure 2 Identification of the positive transformants of *A. tumefaciens* by PCR analysis

注: M: DL2000 marker; 1: 阳性质粒 pYN6982 对照; 2: 阴性对照; 3-8: 转化的农杆菌 LBA4404 单菌落。

Note: M: DL2000 marker; 1: Positive plasmid control pYN6982; 2: Negative control; 3-8: Different clones of LBA4404 transformants.

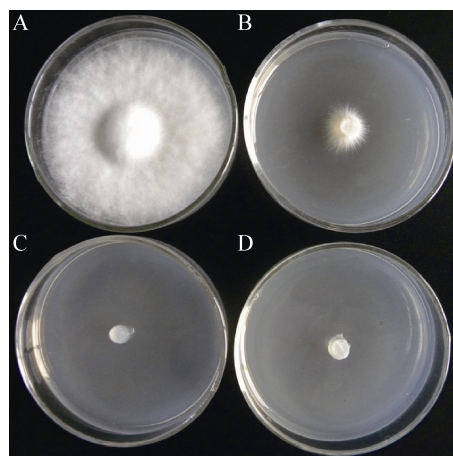


图 3 斑玉蕈 SIEF3133 菌株的潮霉素抗性测试

Figure 3 Experiment on hygromycin B resistance of *H. marmoreus* SIEF3133 strain

Note: A: CK; B: Hyg 10 mg/L; C: Hyg 20 mg/L; D: Hyg 30 mg/L.

2.3 头孢噻肟钠对斑玉蕈菌丝的毒性试验

在转化子的筛选过程中,一定浓度的头孢噻肟钠可以抑制农杆菌的生长,然而并不清楚在这个过程中,头孢噻肟钠是否会影响斑玉蕈菌丝的再生。结果表明,斑玉蕈 SIEF3133 菌株在头孢噻肟钠浓度为 200、400、600、800 mg/L 的固体 PDA 培养基上均能正常生长,其生长速度和 CK 没有显著性差异(图 4),说明合适浓度的头孢噻肟钠对斑玉蕈的正常生长没有显著的毒性。又由于通常农杆菌在头孢噻肟钠为 400 mg/L 的培养基上已经不能生长,由此我们选择 400 mg/L 的头孢噻肟钠作为转基因斑玉蕈筛选时抑制农杆菌生长的合适浓度。

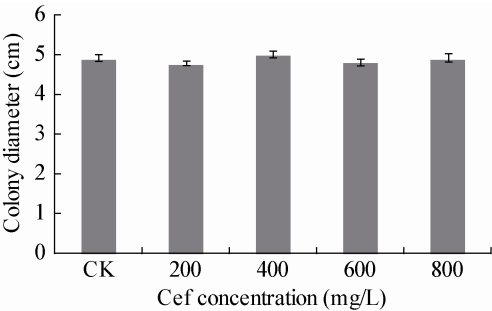


图 4 不同浓度头孢噻肟钠对斑玉蕈菌丝生长的影响
Figure 4 Effects of different concentrations of cefotaxime sodium on the growth of *H. marmoreus* mycelium

2.4 初筛转化子的 PCR 检测

随机挑选的 8 个拟转化子,提取菌丝基因组 DNA,以 *hph* 基因上下游引物 Hph-F1 和 Hph-R1 进行 PCR 扩增检测(图 5)。PCR 产物经凝胶电泳检测后,可以看到 8 个转化子都明显出现了 *hph* 基因的扩增条带,约为 600 bp。因此初步判定这 8 个转化子呈 PCR 阳性。

2.5 抗性转化子的复筛

由图 6 结果可知,将初筛培养基上能生长的拟转化子经 PCR 验证后转接到含 30 mg/L 潮霉素的 PDA 抗性培养基上进行复筛时,尽管 3 个转化子生长速度有所差异,但都能在复筛培养基上生长。由此进一步确定了转基因斑玉蕈中 *hph* 基因已经表达,转基因斑玉蕈可以在含较高浓度潮霉素的 PDA 培养基上生长。

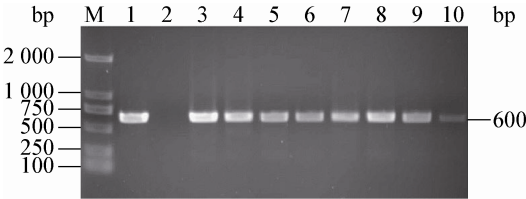


图 5 斑玉蕈抗性转化子的 PCR 鉴定
Figure 5 Confirmation of *H. marmoreus* transformants with PCR amplification
注: M: DL2000 marker; 1: 阳性质粒 pYN6982 对照; 2: 阴性对照; 3-10: 抗性转化子。
Note: M: DL2000 marker; 1: Positive plasmid control pYN6982; 2: Negative control; 3-10: Resistant transformants.

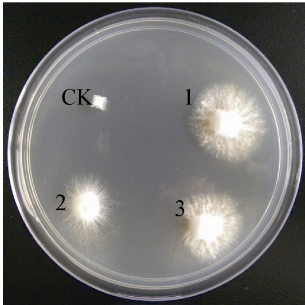


图 6 斑玉蕈转化子的复筛
Figure 6 Secondary screening test of *H. marmoreus* transformants
注: CK: 对照; 1-3: 阳性转化子。
Note: CK: Control; 1-3: Positive transformants.

2.6 斑玉蕈转化子中 egfp 基因表达情况分析

由图 7 结果可知,虽然有背景荧光存在,挑取的转基因斑玉蕈菌丝能够在激发光的激发下显示一定程度的绿色荧光信号,而非转化子斑玉蕈则不能够激发出绿色荧光。这一结果表明 *egfp* 基因已经转入到斑玉蕈细胞中并且得到了表达。图 7 中转化子荧光信号的强度相对较弱,推测可能是由于 EGFP 蛋白在斑玉蕈中存在翻译或功能表达等方面的问题。

2.7 斑玉蕈转化子的遗传稳定性试验

随机挑选的 6 个转基因斑玉蕈菌株在无潮霉素选择压力的 PDA 固体培养基上分别继代培养 5 次后,再次转入含有 20 mg/L 潮霉素的培养基中进行培养。对提取的基因组 DNA 进行 PCR 检测,6 个转基因斑玉蕈菌株都可以扩增出 *hph* 目的条带,证明 *hph* 基因在转基因斑玉蕈中可以稳定遗传(图 8)。

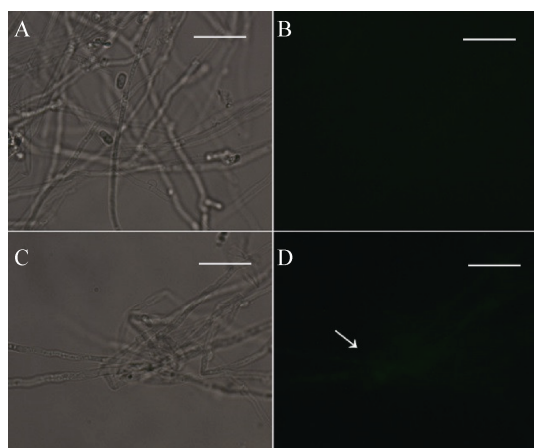


图7 斑玉蕈转化子中绿色荧光的检测

Figure 7 Expression of EGFP in *H. marmoreus* transformants

注：A、B：非转化子明视野和荧光显微图；C、D：转化子明视野和荧光显微图。标尺：20 μm。

Note: A, B: Bright field image and fluorescence microscopic images of the wild-type *H. marmoreus* mycelia, respectively; C, D: Bright field image and green fluorescence of the mycelia of transformant. Bar: 20 μm.

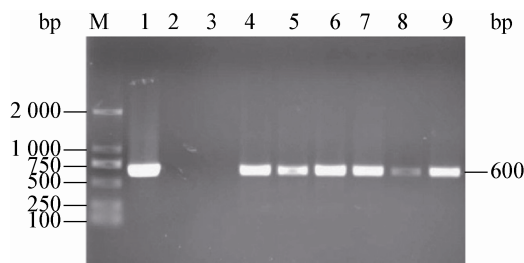


图8 抗性转化子稳定性的PCR检测

Figure 8 PCR analysis of stability of resistant transformants

注：M：DL2000 marker；1：阳性质粒 pYN6982 对照；2：阴性对照(水)；3：非转化子对照；4-9：抗性转化子。

Note: M: DL2000 marker; 1: Positive plasmid control pYN6982; 2: Negative control (ddH₂O); 3: Non-transformant control; 4-9: Resistant transformants.

2.8 斑玉蕈转化子中 *kan* 基因的PCR检测

由图9的PCR检测结果可知，在随即挑选的8个转基因斑玉蕈菌株中有2个的基因组中可以扩增出 *kan* 基因目的条带。但由质粒 pYN6982 的图谱(图1)可知，载体上 *kan* 基因并不位于 T-DNA 左右边界重复序列之间，因此我们推测在这两个转基因斑玉蕈菌株的基因组中可能插入了载体 T-DNA 边界重复序列之外的碱基序列。

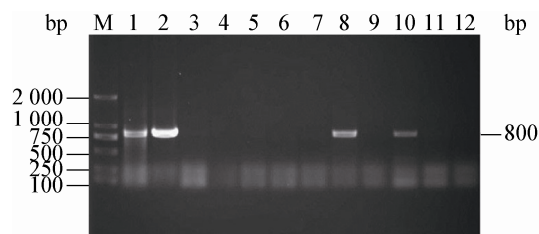


图9 抗性转化子基因组DNA中 *kan* 基因的PCR扩增
Figure 9 PCR amplifications of *kan* gene from transformants genomic DNA

注：M：DL2000 marker；1：农杆菌转化子对照；2：阳性质粒 pYN6982 对照；3：阴性对照(水)；4：非转化子对照；5-12：抗性转化子。

Note: M: DL2000 marker; 1: LBA4404 transformants control; 2: Positive plasmid control pYN6982; 3: Negative control (ddH₂O); 4: Non-transformant control; 5-12: Resistant transformants.

2.9 农杆菌转化效果分析

利用1.2.4的统计方法，统计5次独立试验中的抗性斑玉蕈菌落数，平均转化效率约为6.3个/皿。其中，单个培养皿中抗性斑玉蕈菌落数最高可达10个/皿。

3 讨论

ATMT 技术不需要传统转化方法中繁琐的原生质体制备过程，转化的受体选择灵活，菌丝、孢子和菌褶组织的完整细胞都可以作为转化的受体材料^[10]。但不同的转化受体及其预处理方式的不同，可能直接影响转化效率的高低。本试验采用均质仪打碎的斑玉蕈双核菌丝作为农杆菌转化的受体，成功获得了转基因斑玉蕈菌株，平均转化效率约为6.3个/皿。Hatoh等^[11]曾报道利用农杆菌转化斑玉蕈获得了86个转化子，但由于试验所用的斑玉蕈菌株、质粒载体等的不同，很难将其试验结果与本试验的转化效率进行简单的比较。但可以肯定的是，由于双核菌丝经打碎后的再生菌丝比较幼嫩，易被农杆菌侵染，而且菌丝打碎后的再生能力强，且其制备容易，因而是农杆菌转化的合适受体。

遗传转化方法的建立，目的基因导入并不是转化的终点，更重要的是目的基因要整合到宿主基因组上，并得到正常和稳定的表达。*egfp* 作为一种报告基因，已经在许多领域有所应用，如分子标记、

生物传感器^[12-13]等。在斑玉蕈中引入该基因能够为研究基因的表达调控机制提供重要工具。所获得的转化子荧光信号的强度相对较弱,我们推测可能是由于 *egfp* 基因的 DNA 序列和斑玉蕈的密码子偏好性不同所致。这提示我们可以参照斑玉蕈的密码子偏爱性进行 *egfp* 基因的密码子优化,从而使 *egfp* 成为更敏感、高效的斑玉蕈报告基因。另外,有研究表明内含子可能在报告基因的表达中起着重要的调控作用^[14-15]。下一步研究中我们将对内含子的来源及其在报告基因中的位置进行探索,以求建立起以灵敏的 *egfp* 作为报告基因的斑玉蕈报告系统。

尽管在植物和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)^[16] 的农杆菌转化中,曾报道过 T-DNA 边界重复序列之外的载体序列转移到受体细胞中的现象,但在食用菌的相关农杆菌转化研究中未见报道。通常认为双载体上 T-DNA 边界重复序列之外的 DNA 序列是不转移和整合到受体基因组上的,目前对农杆菌中 T-链形成时边界序列的“通读”现象的机理还不是很清楚。值得注意的是,本研究获得的斑玉蕈转化子中产生了载体 T-DNA 边界重复序列之外的 DNA 序列转移到斑玉蕈细胞中的现象(图 9),因此在利用斑玉蕈转化子的 T-DNA 标签克隆斑玉蕈基因组基因的过程中要注意这一问题,这个比通常认为的 T-DNA 标签更大的随机插入突变标记使得克隆 T-DNA 侧翼的基因组序列变得更复杂。同时,此现象也提示研究者需要对 T-DNA 形成及转移的相关原理进行进一步的研究。

由于没有斑玉蕈全基因组序列信息,目前对斑玉蕈功能基因和代谢调控途径方面的研究还比较薄弱。而本研究对斑玉蕈的基因功能研究、定向育种研究提供了一个有效手段,具有重要的科研和潜在应用价值。在后续的实验中,我们将在以下 3 个方面对斑玉蕈转化做进一步探究:(1) 对获得的转基因菌株进行 Southern blot 杂交分析。(2) 进行转基因菌株的结实性试验,观察菌株的出菇生长情况。(3) 构建合适的表达载体,利用在斑玉蕈中构建的 ATMT 转化方法,对斑玉蕈相关基因功能进行研究。

致谢:承蒙上海市农业科学院生物技术研究所以姚泉洪研究员在质粒构建等方面给与了大力支持和悉心指导,特此表示衷心的感谢。

参考文献

- [1] Michiels CB, Hooykaas PJ, Hondel CA, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. *Current Genetics*, 2005, 48: 1-17.
- [2] Liu Y, Wang SX, Yin YG, et al. Polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation of the fused *egfp-hph* gene into *Pleurotus ostreatus*[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(19): 4345-4353.
- [3] Rhee VD, Graca PMA, Huizing HJ, et al. Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* to hygromycin B resistance[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1996, 250: 252-258.
- [4] Sunagawa M, Magae Y, Yumi M. Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 211(2): 143-146.
- [5] Cummings WJ, Celerin M, Crodian J, et al. Insertional mutagenesis in *Coprinus cinereus*: use of a dominant selectable marker to generate tagged sporulation-defective mutants[J]. *Current Genetics*, 1999, 36: 371-382.
- [6] 李巍, 刘秀明, 李洪志, 等. 农杆菌介导的碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)转化金针菇的研究[J]. *菌物学报*, 2011, 30(1): 46-53.
- [7] Chen X, Stone M, Schlagnhauser C, et al. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 4510-4513.
- [8] Wang J, Guo L, Zhang K, et al. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Volvariella volvacea*[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99: 8524-8527.
- [9] Ding Y, Liang S, Lei J, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated fused *egfp-hph* gene expression under the control of *gpd* promoter in *Pleurotus ostreatus*[J]. *Microbiological Research*, 2011, 166: 314-322.
- [10] 陈东亮, 李纪元, 范正琪. 根癌农杆菌介导真菌遗传转化的影响因素及应用[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(7): 3317-3320.
- [11] Hatoh K, Izumitsu K, Morita A, et al. Transformation of the mushroom species *Hypsizygus marmoreus*, *Flammulina velutipes*, and *Grifola frondosa* by an *Agrobacterium*-mediated method using a universal transformation plasmid[J]. *Mycoscience*, 2013, 54: 8-12.
- [12] He Y, Wu Y, Lan Z, et al. Molecular analysis of the first intron in the bovine myostatin gene[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(7): 4643-4649.
- [13] Rakosy-Tican E, Aurori CM, Dijkstra C, et al. The usefulness of the *gfp* reporter gene for monitoring *Agrobacterium*-mediated transformation of potato dihaploid and tetraploid genotypes[J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(5): 661-671.
- [14] Weise A, Lalonde S, Kuhn C, et al. Introns control expression of sucrose transporter LeSUT1 in trichomes, companion cells and in guard cells[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 68(3): 251-262.
- [15] Burns C, Gregory KE, Kirby M, et al. Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42(3): 191-199.
- [16] Bundock P, Dulk-Ras A, Beijersbergen A, et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *EMBO Journal*, 1995, 14: 3206-3214.