

杨树腐烂病菌(*Cytospora chrysosperma*)原生质体遗传转化体系的构建

刘玲玲¹ 王永林¹ 熊典广¹ 徐鑫¹ 田呈明¹ 梁英梅^{2*}

(1. 北京林业大学林学院 北京 100083)

(2. 北京林业大学标本馆 北京 100083)

摘要:【目的】通过分析不同酶解条件对金黄壳囊孢菌[*Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr.]原生质体释放的影响,建立高效制备原生质体及其遗传转化体系的方法,为开展杨树腐烂病菌的致病分子机制研究奠定基础。【方法】以杨树腐烂病菌菌株 CFCC 89981 为受体,在细胞壁降解酶作用下产生用于转化所需的原生质体,通过 PEG (Polyethylene glycol)介导将 gGFP DNA 导入杨树腐烂病菌的原生质体中获得转化子。经 PCR 扩增、Southern blot 和荧光观察验证 gGFP DNA 插入到杨树腐烂病菌基因组中并表达出 GFP (Green fluorescent protein)蛋白。【结果】以 pH 5.5 的 1.2 mol/L KCl 为稳渗剂,杨树腐烂病菌菌丝经 Driselase 和 Lysing enzymes 共同酶解 4 h 可获得 1.2×10^8 个/mL 原生质体,再生率可达 $63.74\% \pm 9.73\%$, FDA (Fluorescein diacetate)溶液染色结果显示 98% 左右的原生质体具有较高的活力。利用 PEG 介导的遗传转化方法,转化效率可达 76 个/ μg DNA。PCR 检测和 Southern blot 均可在转化子基因组中检测到 GFP 基因片段,且荧光检测转化子的菌丝均呈绿色荧光,表明 GFP 基因在杨树腐烂病菌中表达。此外,GFP 转化子在无潮霉素抗性的 PDA 培养基中多代转接后仍稳定遗传并表达 GFP 蛋白。【结论】通过筛选酶解条件,获得高质量、高活性的杨树腐烂病菌原生质体,并利用 PEG 介导的转化方法建立了高效稳定的原生质体遗传转化体系。该体系的建立为杨树腐烂病菌的后续研究奠定了技术基础。

关键词: 杨树腐烂病, 金黄壳囊孢菌, 原生质体, 遗传转化, GFP 基因

Foundation item: Industry of National Public Welfare (Forestry) Scientific Research of China (No. 201204501); Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20130014110004); Project of Universities in Beijing Supported by Beijing City (No. 2050205)

*Corresponding author: Tel: 86-10-62336316; E-mail: liangym@bjfu.edu.cn

Received: December 28, 2016; Accepted: March 23, 2017; Published online (www.cnki.net): May 09, 2017

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项项目(No. 201204501); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(No. 20130014110004); 北京市支持中央在京高校共建项目(No. 2050205)

*通讯作者: Tel: 86-10-62336316; E-mail: liangym@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2016-12-28; 接受日期: 2017-03-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-09

Genetic transformation system of *Cytospora chrysosperma*, the causal agent of poplar canker

LIU Ling-Ling¹ WANG Yong-Lin¹ XIONG Dian-Guang¹ XU Xin¹
TIAN Cheng-Ming¹ LIANG Ying-Mei^{2*}

(1. College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

(2. Museum of Beijing Forestry University, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] To explore the molecular pathogenic mechanism of *C. chrysosperma*, a protoplast preparation and transformation method is established, and the transformation efficiency and the stability of transformants are analyzed. [Methods] In this study, strain CFCC 89981 served as the recipient. The protoplasts were prepared using cell wall degrading enzymes, and transformed by gGFP plasmid mediated by PEG. PCR amplification, Southern blot and fluorescent observation were used to confirm the transformation efficiency and the genetic stability of GFP-tagged transformants. [Results] High-quality protoplasts with excellent regeneration efficiency (63.74%±9.73%) were generated using Driselase and Lysing enzyme digesting fresh mycelium with 1.2 mol/L KCl in pH 5.5 for 4 h and transformed with the gGFP plasmid using PEG. A total of 304 hygromycin B resistant transformants was obtained though added 4 µg DNA. FDA staining results showed that 98% of protoplasts exhibited high activity. The GFP fragments were detectable in the genomes of transformants by both PCR amplification and Southern blot analysis, and the fluorescence detection results also indicated that the GFP gene had been integrated and was stably expressed in the *C. chrysosperma* genome. Highly intense green fluorescence was observed in single-spore purified transformants. The GFP gene and *hph* gene were stably expressed after subculturing in PDA plates without hygromycin B resistant. [Conclusion] The high quality and viable protoplast of *C. chrysosperma* preparation and transformation system are established, it will provide a solid foundation and greatly facilitate the future studies on functional genomics and pathogenic molecular mechanism in *C. chrysosperma*.

Keywords: Poplar canker, *Cytospora chrysosperma*, Protoplast, Genetic transformation, GFP gene

杨树腐烂病(Poplar canker)是我国杨树上的 一种毁灭性病害,病死率可达 70%^[1],其病原菌除了零星报道有 *Leucocytophora nivea* 以外^[2],主要以 金黄壳囊孢菌[*Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr.] 为主。发病初期常表现为枝条枯死,后期造成树木 整株死亡,严重时导致整片杨树林的大量枯死,给 绿化和造林工作带来了重大经济损失^[3-4]。

杨树腐烂病菌是子囊菌门(Ascomycota)壳孢 属(*Cytospora*)中的一种条件致病菌(Opportunistic plant pathogen),能在健康枝条内长期潜伏而不发 病,直至树势衰弱时,病斑才开始扩展^[5-6]。现有的 防治措施主要以培育抗病品种、化学防治和生物防 治为主,虽已取得一定的成功,但仍存在污染环境、 产生诱导抗药性和存在生态安全隐患等问题^[7-9]。

在病原菌与寄主互作的过程中,病原菌也会进化产 生强毒性的致病基因来克服外界不良环境。因此, 从分子生物学角度阐释病原菌如何在识别、克服寄 主的防御系统,如何在与寄主互作过程中进行信号 传导以及调控相关基因的表达等成为研究病害形 成的新焦点^[10]。随着基因组测序技术的快速发展, 遗传转化体系的建立为从基因水平解析杨树腐烂 病菌的致病机理提供新方法,进而为针对靶标位点 设计新农药提供理论基础。

CaCl₂/聚乙二醇(PEG)介导的原生质体转化 技术是子囊菌中常用的一种基因功能研究方法。 该方法通过细胞壁降解酶的作用酶解获得原生质 体,在 PEG 的作用下将外源 DNA 整合到受体的 基因组中筛选获得转化子^[11]。自 PEG 转化法在构

巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中建立以来^[12], Yoder 实验室通过改变稳渗液和细胞壁降解酶等酶解条件,在玉米小斑病菌(*Cochliobolus heterostrophus*)^[13]和菜豆炭疽病菌(*Colletotrichum lindemuthianum*)^[14]等多种病原真菌中建立 PEG 转化体系,并尝试使用 *amdS* 和 *hphB* 等标记基因筛选突变体,极大地推进了 PEG 转化体系在丝状病原真菌研究中的应用。

尽管 PEG 介导的遗传转化技术以其操作简单、无需特殊设备等优点已成为丝状真菌中常用的遗传转化方法之一,但原生质体及转化效率仍是制约 PEG 遗传转化技术成功的关键^[11]。如在大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)中, Dobinson 于 1995 年首次建立了 PEG 遗传转化方法,但较低的转化效率(3–5 个/ μg DNA)制约了该方法的推广及应用^[15];随后,研究者又尝试使用 ATMT 转化法^[16–18]解决转化效率低的问题,但大丽轮枝菌(*V. dahliae*)中 PEG 转化效率低的问题一直未得到解决,直至 2013 年王永林等通过优化 PEG 转化法中酶和稳渗液等条件,极大地提高了转化效率(10–50 个/ μg DNA)^[19],为阐释黄栌枯萎病菌微菌核形成过程中相关基因的调控奠定良好的技术基础^[19–23]。

然而杨树腐烂病菌(*C. chrysosperma*)作为杨树的一种毁灭性病害,目前还未有针对其遗传转化体系方面的研究。同属于壳孢属(*Cytospora*)中的苹果腐烂病菌(*Valsa mali*) (无性型为 *Cytospora mali*) 由高静等已建立 PEG 转化体系,在 Driselase 和 Lysing enzymes 的作用下酶解获得原生质体,并通过 PEG 介导获得 GFP 转化子^[24],为苹果腐烂病菌的基因功能研究开启了新篇章^[25]。本研究初期曾尝试将苹果腐烂病菌中的转化体系应用到杨树腐烂病菌(*C. chrysosperma*)中,但实验结果并不理想,原生质体的释放量较低(10^3 – 10^4 个/mL),重复多次均难以获得转化子。因此解决原生质体制备困难的难题成为建立杨树腐烂病菌遗传转化体系的关键。

本研究旨在通过筛选酶解条件解决原生质体制备困难的难题,建立一个基于杨树腐烂病菌(*C.*

chrysosperma)的高效、稳定的遗传转化体系,为杨树腐烂病菌的分子生物学研究,特别是杨树腐烂病菌的基因功能研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试菌株和质粒: 转化受体金黄壳孢菌(*C. chrysosperma*)是本实验室采集、鉴定并保藏于中国林业微生物菌种保藏中心(保藏号为 CFCC 89981)。含潮霉素 B 抗性基因(*hph*)的 gGFP 质粒购自 Fungal Genetics Stock Center (Kansas City, KS, USA)。

1.1.2 主要试剂、培养基和仪器: Driselase、Lysing enzymes 和 Fluorescein diacetate, Sigma 公司; 蜗牛酶, Coolaber 公司; 潮霉素 B, 生工生物工程(上海)股份有限公司; The DIG High Prime DNA Labeling Protocol 和 Detection Starter Kit I Protocol, 德国 Roche 公司; STC 溶液、40% PTC 溶液及 CM、PDA、YEPD 和 TB₃ 液体(固体)培养基均参照李思蒙^[26]的配方配制。

Veriti[®]96 孔快速热循环仪, Applied Biosystems 公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; 恒温振荡培养箱, 北京博宇宝威实验设备公司; 电热恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 荧光显微镜, 德国 Leica 公司。

1.2 供试菌株对潮霉素 B 敏感性的测定

将 CFCC 89981 菌株接到 PDA 平板上,在 25 °C 黑暗培养 4 d 后,沿菌落边缘用打孔器($\phi=5$ mm)打取菌丝块,分别转接到潮霉素 B 浓度为 0、5、10、15、20、25、30 和 35 mg/L 的 PDA 培养基中,置于 25 °C 培养箱中黑暗培养,每个处理 5 个重复。5 d 后观察、测量并记录生长状况。

1.3 杨树腐烂病菌 CFCC 89981 原生质体的制备

1.3.1 杨树腐烂病菌 CFCC 89981 细胞壁酶解条件优化: 为了明确菌丝细胞壁降解酶体系,实验选取了 4 种稳渗液和 3 种酶配比。当酶量为 20 g/L Driselase 和 8 g/L Lysing enzymes 时,选用 4 种稳渗液分别为 0.7 mol/L NaCl (溶于 10 mmol/L NaH₂PO₄, 用 1 mol/L 的 Na₂HPO₄ 调 pH 值为 5.5)、

0.7 mol/L NaCl (溶于无菌水)、1.2 mol/L KCl (溶于 10 mmol/L NaH₂PO₄, 用 1 mol/L 的 Na₂HPO₄ 调 pH 值为 5.5) 和 1.2 mol/L KCl (溶于无菌水) 对杨树腐烂病菌幼嫩菌丝进行酶解。在确定最优稳渗液后, 分别用 20 g/L Driselase+8 g/L Lysing enzymes、20 g/L Driselase+30 g/L 蜗牛酶及 20 g/L Driselase+8 g/L Lysing enzymes+30 g/L 蜗牛酶 3 种酶组合对杨树腐烂病原菌 CFCC 89981 的菌丝进行酶解, 每隔 1 h 统计一次原生质体的数量, 每个处理重复 3 次, 最终选择最优的酶配比和时间进行杨树腐烂病菌 CFCC 89981 原生质体的制备。

1.3.2 杨树腐烂病菌原生质体的制备: 挑取杨树腐烂病菌的分生孢子以无菌水制成分生孢子悬浮液加入 100 mL 的 YEPD 液体培养基中, 25 °C、150 r/min 振荡培养 2 d。单层 22–25 μm 孔隙的 Miracloth 过滤收集菌丝, 用稳渗液冲洗培养 48 h 后收集的菌丝 3–4 次, 收集至 20 mL 酶解液中, 于 30 °C、70 r/min 摇床中酶解。酶解 4 h 后, 用双层 Miracloth 过滤酶解后的混合物, 稳渗液洗涤 3–4 次, 将原生质体滤液收集至离心管中。4 °C、3 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 加入 15 mL 的稳渗液悬浮原生质体, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 加入少量的 STC 悬浮原生质体沉淀, 镜检并用血球计数板计数, 若浓度过高则继续加入适量的 STC 溶液, 使原生质体的终浓度达到 10⁸ 个/mL, 用于下一步实验操作。

1.4 原生质体再生

1.4.1 原生质体再生率的统计: 处理组在最优体系下酶解 4 h 后的原生质体悬浮液用稳渗剂稀释到 10⁴ 个/mL, 取 2 μL 原生质体与 TB₃ 培养基混匀后倒板, 25 °C 培养, 对照组用无菌水稀释。待长出单菌落后, 统计单菌落的个数, 计算再生率。每个处理重复 3 次^[27]。

$$\text{再生率} = \frac{N_R - N_C}{N_T} \times 100\%$$

其中, N_R : 稳渗液稀释的原生质体的数目; N_C : 无菌水稀释的原生质体的数目; N_T : 原生质体的总数。

1.4.2 FDA 染色: 为验证原生质体的活力, 吸取

200 μL 的原生质体于 2 mL 的离心管中, 向离心管中滴加 2 μL 浓度为 5 g/L 的 FDA 溶液, 室温黑暗静置 5 min。利用荧光显微镜观察原生质体的形态和荧光状况, 若原生质体形状完好且镜检呈强绿色荧光即表示原生质体的活力高。

1.5 杨树腐烂病菌原生质体的转化与再生

取 250 μL 上述 STC 溶液重悬的原生质体于 50 mL 离心管中, 向其中加入 4 μg gGFP DNA, 轻弹混匀, 室温静置 20 min。加入 1.2 mL 40% 的 PTC 后, 轻弹混匀, 室温静置 20 min。加入 3 mL TB₃ 液体培养基, 翻转混匀, 室温静置 2 min; 再加入 5 mL TB₃ 液体培养基, 翻转混匀, 室温静置 2 min。将离心管倾斜 60° 放入摇床中固定, 25 °C、70 r/min 培养 14–20 h。

镜检观察原生质体的再生情况及荧光状况, 向再生后的液体中加入 40 mL 潮霉素浓度为 25 mg/L 的 TB₃ 固体培养基, 颠倒混匀, 倒板, 于 25 °C 培养箱中黑暗培养。

1.6 杨树腐烂病菌转化子的获得

待菌落从 TB₃ 固体培养基上长出后, 用潮霉素浓度为 30 mg/L 的 PDA 培养基覆盖, 于 25 °C 黑暗培养箱中培养。待长出单菌落后挑取菌丝, 在激光共聚焦显微镜 SP-5 下观察 GFP 的荧光表达状况。将发绿色荧光的单菌落转接到潮霉素浓度为 30 mg/L 的 PDA 平板上, 于 25 °C 黑暗培养。待其长出菌丝后, 一份接到 PDA 冻存管中, 于 4 °C 保存, 另一份转接到含潮霉素 B 抗性的 PDA 平板上, 待进一步验证。

1.7 杨树腐烂病菌 GFP 转化子的鉴定

1.7.1 PCR: 随机选取 5 个 GFP 转化子, 将其接到铺有玻璃纸的潮霉素浓度为 30 mg/L 的 PDA 平板上, 将野生型菌株接到铺有玻璃纸的 PDA 平板上, 置于 25 °C 黑暗培养。待玻璃纸上长满菌丝后, 取菌丝于 1.5 mL 的离心管中, 液氮冷冻研磨, 利用 CTAB 法提取 DNA。利用表 1 中的引物对其进行 PCR 检测, 鉴定阳性转化子。PCR 反应体系及条件参照李思蒙^[26]。

表 1 杨树腐烂病菌 CFCC 89981 *GFP* 转化子
PCR 检测引物^[28]

Table 1 PCR testing primers of *GFP* transformants of
C. chrysosperma CFCC 89981^[28]

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
hph-sec	GCGAAGAATCTCGTGCTTTC
hph-for	GATGTTGGCGACCTCGTATT
GFPfor	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
GFPprev	TTACTTGTACAGCTCGTCCATG

1.7.2 Southern blot: 将 *GFP* 转化子和野生型菌株转接到 PDA 平板上培养 4 d 后, 于菌落边缘取菌丝块至 70 mL CM 液体培养基中, 25 °C、150 r/min 振荡培养 5 d。收集菌丝, 冷冻抽干后, 采用 CTAB 法提取 DNA。用 *Xho* I 限制性内切酶对野生型菌株的 DNA 和 5 个转化子菌株的 DNA 进行酶切、电泳、转膜, 以 GFP 片段(GFPfor/GFPprev) 为探针对其进行 Southern blot。详细步骤参照 The DIG High Prime DNA Labeling Protocol 和 Detection Starter Kit I Protocol。

1.8 杨树腐烂病菌转化子的稳定性检测

将单孢纯化后的 *GFP* 转化子转接到无潮霉素抗性的 PDA 培养基中, 于 25 °C 黑暗培养 5 d 后,

沿菌落边缘用打孔器($\phi=5$ mm)打取菌丝块, 并将其继续转接到无潮霉素抗性的 PDA 培养基中于 25 °C 黑暗培养 5 d, 如此连续转接并于 25 °C 黑暗培养 5 代后, 再将其转接到含有潮霉素浓度为 30 mg/L 的 PDA 培养基中, 25 °C 黑暗培养 5 d, 观察转化子是否仍对潮霉素保持抗性, 并用荧光显微镜观察 GFP 基因是否表达。

2 结果与分析

2.1 杨树腐烂病菌 CFCC 89981 对潮霉素 B 敏感性的测定

杨树腐烂病菌野生型菌株 CFCC 89981 在 25 °C 暗培养 5 d 后, 在不含潮霉素 B 抗性的 PDA 平板中, 菌丝生长良好(图 1A), 菌落平均直径达 9 cm (包括菌碟直径, 下同); 但在含有潮霉素 B 抗性的 PDA 培养基中, 菌丝生长均受到抑制(图 1B-H)。当潮霉素 B 的浓度为 5 mg/L 时菌落平均直径为 3.12 cm (图 1B), 当潮霉素 B 浓度为 10 mg/L 时菌落生长受到抑制, 直径仅为 0.73 cm (图 1C), 浓度增加到 15 mg/L 时(图 1D)菌落停止生长。说明潮霉素 B 能够有效抑制杨树腐烂病菌野生型菌株的生长。后续转化实验中, 初筛时所用的潮霉素 B 浓度为 25 mg/L, 覆盖时所用的潮霉素 B 浓度为 30 mg/L。

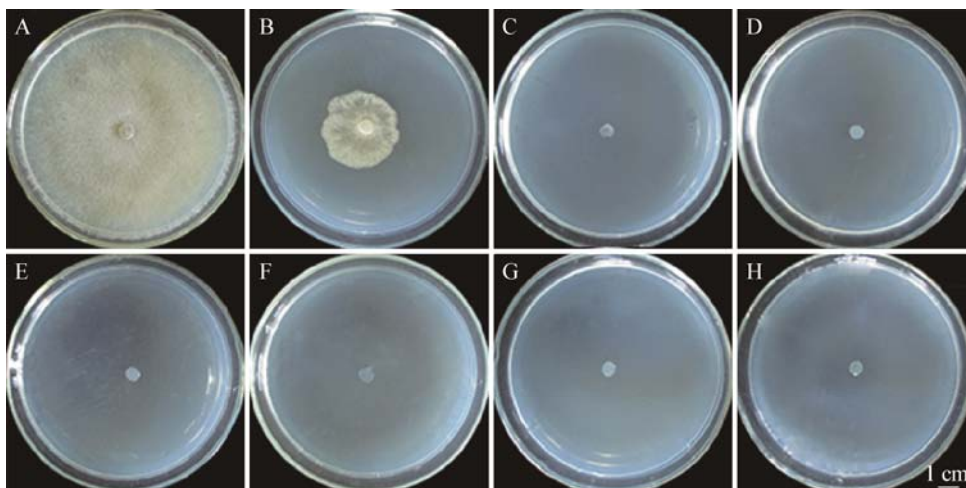


图 1 杨树腐烂病菌 CFCC 89981 对潮霉素 B 的敏感性

Figure 1 Sensitivity of *C. chrysosperma* strain CFCC 89981 to hygromycin B

注: A-H: 潮霉素 B 的浓度依次为 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 和 35 mg/L。

Note: A-H: Concentrations of hygromycin B is 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 mg/L, respectively.

2.2 稳渗液对杨树腐烂病菌 CFCC 89981 原生质体释放的影响

相同的酶配比下,分别选用4种稳渗液对幼嫩菌丝进行了酶解。图2结果显示:随着酶解时间的增加,4种稳渗液均利于原生质体的释放,但释放效果存在差异。其中,以pH 7.0的1.2 mol/L KCl和pH 5.5的0.7 mol/L NaCl的酶解效果较差,原生质体的释放量最多仅有 8×10^7 个/mL;其次为pH 7.0的0.7 mol/L NaCl,该条件下初期原生质体的释放量较低,6 h后释放量显著增多,达到 1×10^8 个/mL;最优的稳渗液为pH 5.5的1.2 mol/L KCl,酶解4 h原生质体的数量已达到 1.2×10^8 个/mL,6 h原生质体的释放量达到最大值 1.8×10^8 个/mL,明显高于其他3种稳渗液,满足后续实验中对原生质体数量的要求。因此后续实验中选用pH 5.5的1.2 mol/L KCl作为稳渗液是最优的。

2.3 酶对杨树腐烂病菌 CFCC 89981 原生质体释放的影响

以pH 5.5的1.2 mol/L KCl作为稳渗液的前提下,选用3种酶比对幼嫩菌丝进行酶解的结果(图3)发现:随着酶解时间的增加,在3种酶配比中原生质体的释放量均增多。其中,20 g/L Driselase+30 g/L 蜗牛酶的酶解效果较差,释放原生质体最多

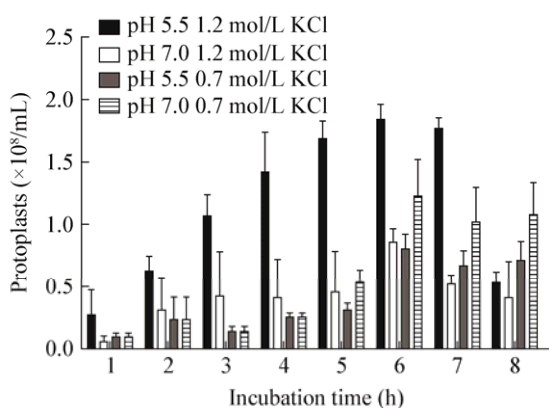


图2 不同稳渗液对杨树腐烂病菌 CFCC 89981 原生质体释放的影响

Figure 2 Effects of different osmotic buffers on protoplasts released from *C. chrysosperma* strain CFCC 89981 mycelia

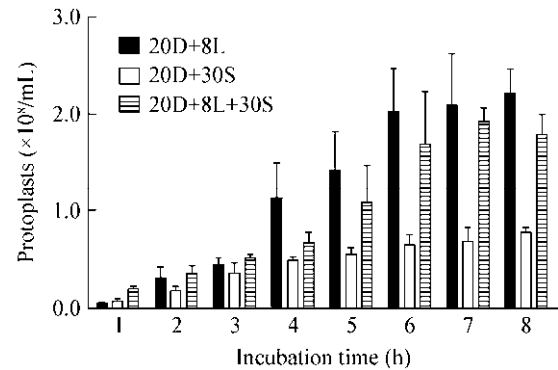


图3 不同酶比对杨树腐烂病菌 CFCC 89981 原生质体释放的影响

Figure 3 Effects of different enzyme proportions on protoplasts released from *C. chrysosperma* strain CFCC 89981 mycelia

注 20D+8L、20D+30S和20D+8L+30S分别是20 g/L Driselase+8 g/L Lysing enzymes、20 g/L Driselase+30 g/L 蜗牛酶和20 g/L Driselase+8 g/L Lysing enzymes+30 g/L 蜗牛酶溶解于pH 5.5 1.2 mol/L KCl中。

Note: 20D+8L, 20D+30S and 20D+8L+30S is 20 g/L Driselase+8 g/L Lysing enzymes, 20 g/L Driselase+30 g/L Snailase, 20 g/L Driselase+8 g/L Lysing enzymes+30 g/L Snailase in the buffer pH 5.5 1.2 mol/L KCl, respectively.

仅有 8×10^7 个/mL,其次为20 g/L Driselase+8 g/L Lysing enzymes+30 g/L 蜗牛酶,酶解效果最好的配比是20 g/L Driselase+8 g/L Lysing enzymes,酶解4 h原生质体的释放量即达到 1.2×10^8 个/mL。持续测定发现随着时间的推移,原生质体的释放量依然在增加,但为了节省实验时间,在后续实验中,以pH 5.5的1.2 mol/L KCl作为稳渗液,选用的酶配比为20 g/L Driselase+8 g/L Lysing enzymes,酶解时间为4 h。

2.4 原生质体的再生率及活力验证

镜检观察发现原生质体的释放方式多为顶端释放(图4B、C),也有侧位释放(图4D、E),其直径为6.63–21.95 μm ,平均直径为13.46 μm 。

在最优体系下酶解4 h后,释放的原生质体的再生率为 $63.74\% \pm 9.73\%$,且利用FDA染色验证原生质体的活力时发现98%以上的原生质体均形状完好且呈现绿色荧光,表明在该体系下获得的原生质体具有很高的活性。

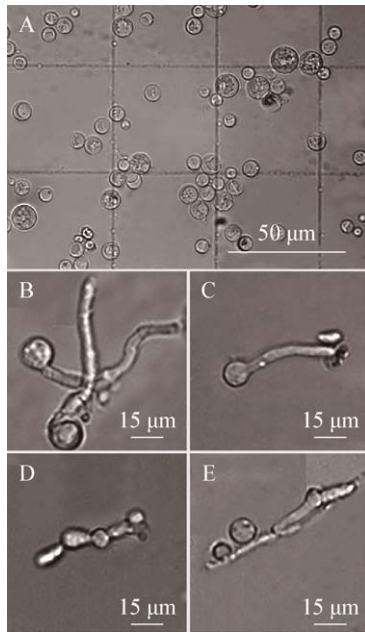


图4 杨树腐烂病菌 CFCC 89981 原生质体的形态图及释放方式

Figure 4 Protoplast morphology and types of protoplasts released by *C. chrysosperma* strain CFCC 89981

注:A:杨树腐烂病菌菌株 89981 原生质体的形态图;B和C:原生质体顶端释放的形态图;D和E:原生质体侧位释放的形态图.

Note: A: Protoplast morphology of *C. chrysosperma* 89981; B and C: Top types of protoplasts released by *C. chrysosperma* 89981; D and E: Side position of types of protoplasts released by *C. chrysosperma* 89981.

2.5 杨树腐烂病菌 CFCC 89981 gGFP 转化子的筛选

在转化过程中当原生质体的浓度达到 10^8 个/mL 时再生效果较好,且荧光显微镜镜检观察可发现原生质体再生后菌丝有明显的绿色荧光(图 5A)。依据覆盖后的 PDA (潮霉素浓度为 30 mg/L) 平板上长出的单菌落的数量来计算转化效率,结果显示在加入质粒 DNA 为 4 μ g 时,平均获得 304 个转化子,平均转化效率为 76 个/ μ g DNA。

原生质体在 TB₃ 液体培养基中再生 16 h 后,镜检观察到部分原生质体及其再生后的菌丝呈绿色荧光(图 5A)。经筛选后得到的转化子镜检观察菌丝呈绿色荧光(图 5B),表明 gGFP DNA 已导入杨树腐烂病菌的原生质体并表达。

2.6 杨树腐烂病菌 CFCC 89981 转化子的 PCR 鉴定

随机挑取 5 个杨树腐烂病菌 GFP 转化子并提取 DNA,以杨树腐烂病菌野生型菌株 CFCC 89981 的 DNA 作为阴性对照,以 gGFP 质粒 DNA 作为阳性对照,分别用潮霉素特异性引物(hph-sec/hph-for)和 GFP 特异性引物(GFPfor/GFPprev)扩增潮霉素片段和 GFP 片段。PCR 结果(图 6)显示:杨树腐烂病

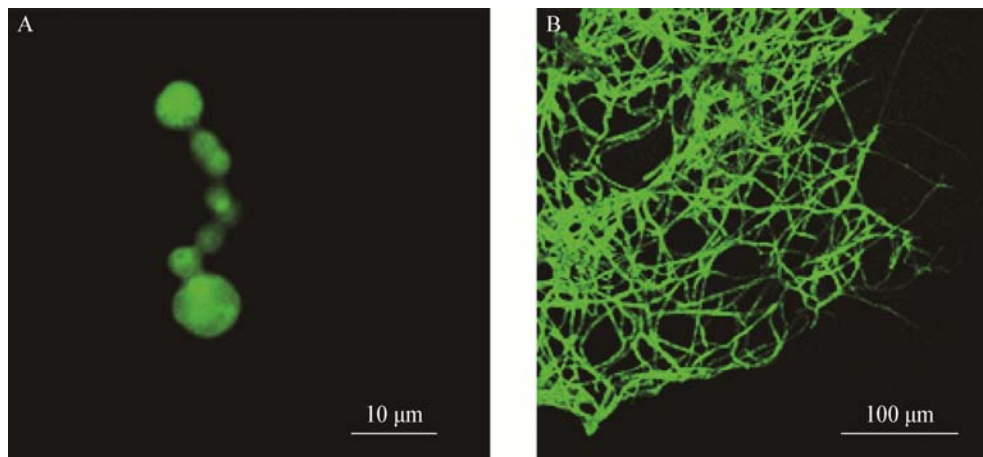


图5 杨树腐烂病菌 CFCC 89981 原生质体的再生及 GFP 转化子的荧光检测

Figure 5 Green fluorescence detection of protoplast regeneration and GFP transformants of *C. chrysosperma*

注:A:原生质体再生的荧光观察;B:杨树腐烂病菌 GFP 转化子的绿色荧光检测.

Note: A: GFP expression of the regeneration of *C. chrysosperma* protoplasts, view under Leica TCS SP5; B: Green fluorescence detection of GFP-tagged *C. chrysosperma* isolate, view under Leica TCS SP5.

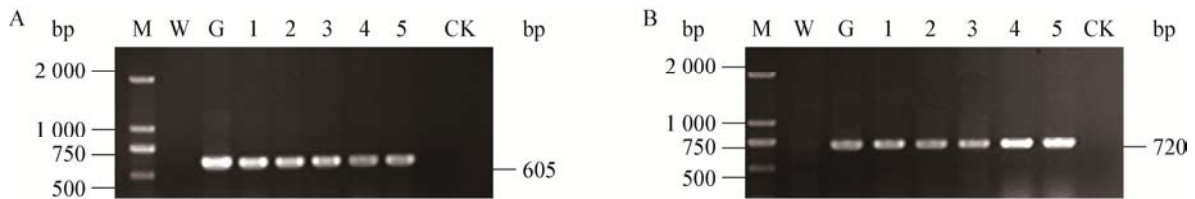


图 6 杨树腐烂病菌 *GFP* 转化子的 PCR 鉴定

Figure 6 PCR identification of *C. chrysosperma* *GFP* transformants

注：A：潮霉素特异性引物扩增结果，在 605 bp 处得到扩增条带；B：GFP 特异性引物扩增结果，在 720 bp 处得到扩增条带。M：DL2000 marker；W：杨树腐烂病菌野生型 DNA；G：gGFP 质粒；1-5：杨树腐烂病菌 *GFP* 转化子 G2、G8、G9、G11、G14；CK：空白对照。

Note: A: PCR amplification of gene *hph*, and the size is 605 bp; B: PCR amplification of *GFP* gene, and the size is 720 bp. M: DL2000 marker; W: *C. chrysosperma* 89981 genomic DNA; G: gGFP plasmid; 1-5: *C. chrysosperma* *GFP* transformants G2, G8, G9, G11 and G14; CK: Blank control.

菌的 *GFP* 转化子和 gGFP 质粒均扩增出目的条带，而野生型菌株作为阴性对照未扩增出目的条带。由 PCR 结果表明 *GFP* 基因和 *hph* 基因均已经整合到杨树腐烂病菌的基因组中。

2.7 杨树腐烂病菌 CFCC 89981 转化子的 Southern blot 鉴定

用 *Xho* I 内切酶对野生型菌株的 DNA 和 *GFP* 转化子菌株(G2、G8、G9、G11 和 G14)的 DNA 进行酶切，以 *GFP* 基因片段为探针，进行 Southern blot 验证。Southern blot 结果(图 7)显示野生型菌株中无杂交信号，在 gGFP 质粒阳性对照和 *GFP* 转化子中均检测到 *GFP* 基因杂交信号，表明 *GFP* 基因已经成功整合到杨树腐烂病菌的基因组中。

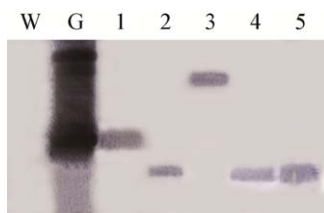


图 7 杨树腐烂病菌 CFCC 89981 *GFP* 转化子的 Southern blot 鉴定

Figure 7 Southern blot analysis of *C. chrysosperma* CFCC 89981 *GFP* transformants

注：W：杨树腐烂病菌菌株 89981，为阴性对照；G：gGFP 质粒，为阳性对照；1-5：杨树腐烂病菌 *GFP* 转化子 G2、G8、G9、G11、G14。

Note: W: *C. chrysosperma* 89981 genomic DNA, negative control; G: gGFP plasmid, positive control; 1-5: *C. chrysosperma* *GFP* transformants G2, G8, G9, G11 and G14.

2.8 杨树腐烂病菌 CFCC 89981 转化子的稳定性分析

将经过 PCR 和 Southern blot 验证后的 5 个已单孢纯化的 *GFP* 转化子接到无潮霉素抗性的 PDA 培养基上，连续转接 5 代后，再转接到含有潮霉素浓度为 30 mg/L 的 PDA 培养基上培养，发现 5 个转化子均能正常表达 *GFP* 蛋白，无衰减现象，且保持对潮霉素 B 的抗性，表明已整合的 *GFP* 基因和 *hph* 基因并未丢失，能够在杨树腐烂病菌 CFCC 89981 中稳定遗传并表达。

3 结论与讨论

PEG 介导的原生质体遗传转化是目前基因功能研究的常用方法之一，已在多种真菌中实现应用。本研究探索了原生质体制备过程中稳渗液和酶配比等条件，确定最优酶解条件，并首次成功构建以 *GFP* 为指示基因、基于杨树腐烂病菌(*C. chrysosperma*)的 PEG 转化体系，且转化效率达到 76 个/ μ g DNA，为进一步开展杨树腐烂病菌的基因功能研究提供了技术支持。

与其他的遗传转化方法相比，PEG 介导的遗传转化方法具有操作简单、周期短等优点，已成为丝状真菌中常用的基因功能研究技术之一，但高活力、高浓度的原生质体制备困难、转化效率低、产生高比例的瞬态转化菌株和多拷贝插入等缺点也同样制约了其在一些真菌中的应用^[11]。其中，能

否获得高活性、高浓度的原生质体是制约其转化效率的主要因素之一。

本研究在查阅苹果腐烂病菌(*V. mali*)^[24]、栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)^[29]和杨树炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)^[28]等多种病原真菌的 PEG 介导的遗传转化方法的基础上,通过改变酶的种类、配比、稳渗液等条件,酶解获得高质量的原生质体,并在此基础上建立了基于杨树腐烂病菌 CFCC 89981 的高效稳定的 PEG 介导的遗传转化体系。在苹果腐烂病菌中,以 1.2 mol/L KCl 为稳渗液,50 g/L Driselase 和 10 g/L Lysing enzymes 共同酶解菌丝 2 h,原生质体的释放量可达 4×10^7 个/mL;而栗疫病菌中则是选用 1.2 mol/L MgSO₄ (10 mmol/L sodium phosphate, pH 5.8) 为稳渗液,在 β -glucuronidase 和 NovoZym 234^[29]或纤维素酶、溶菌酶和蜗牛酶^[30]共同酶解菌丝 2 h 的情况下,获得高浓度的原生质体;杨树炭疽菌中仅以 1% 的 Lysing enzyme 在 0.7 mol/L NaCl 为稳渗液条件下,酶解菌丝 3.5 h 获得 10^8 个/mL 原生质体。相较于其他 3 种而言,本实验中以 pH 5.5 1.2 mol/L KCl 为稳渗液,在 20 g/L Driselase 和 8 g/L Lysing enzymes 的共同作用下,酶解菌丝 4 h 原生质体的释放量即为 10^8 个/mL。实验中发现稳渗液的种类及 pH、菌龄、酶的种类等均会影响原生质体的释放。

稳渗液的种类和 pH 会影响原生质体的释放量。与苹果腐烂病菌(*V. mali*)的 PEG 转化体系相比,本研究通过调整稳渗液的 pH,极大地促进了杨树腐烂病菌(*C. chrysosperma*)原生质体的释放。与未调节 pH 的酶解液相比,将 1.2 mol/L KCl 的 pH 值调至 5.5 后,原生质体的释放量明显增多。此前,在粘细菌^[31]、双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)^[32]和长根鬼伞(*Coprinus macrorhizus*)^[33]中均有通过调节稳渗液的 pH 促进酶活性的发挥进而提高原生质体释放量的报道,发现当 pH 接近最佳的酶化合物的需求时,酶解效果最佳。此外,稳渗液除了作为细胞壁降解酶的溶剂外,还在维持原生质体的内外压力和生理状况中起到重要作用^[34]。

菌丝作为酶解材料,其幼嫩程度直接影响酶解获得的原生质体的数量及质量。幼嫩的菌丝更有利于酶解释放原生质体^[35]。相同条件下,杨树腐烂病菌的孢子在 YEPD 培养基中振荡培养 40–48 h,菌丝的细胞壁易被降解释放原生质体,而实验中孢子振荡培养时间过长或直接酶解菌龄较大的菌丝时,均会降低原生质体的释放量。张志光在探讨真菌原生质体制备技术时指出菌龄对原生质体释放的影响主要是由于细胞壁的成分和结构的变化引起的。随着菌龄的增加,细胞壁上会沉积色素等次生物质,增大酶解难度^[34]。高静等在苹果腐烂病菌的研究中也发现菌丝老化会导致细胞壁加厚,酶解困难,而菌丝过于幼嫩会导致菌丝量不足或酶解得到的原生质体容易破碎,再生困难^[24]。但最适酶解的菌丝年龄会随着转化受体种类的不同存在差异。如在大丽轮枝菌(*V. dahliae*)^[19,36]中,孢子振荡培养 24 h 最适宜酶解释放原生质体,而在三孢布拉氏霉菌(*Blakeslea trispora*)^[37]中是 60 h,凤尾菇(*Pleurotus pulmonarius*)^[38]中则是 48 h。

此外,原生质体的释放过程中,除稳渗液、菌龄外,酶的种类也会对其产生影响。本实验中相较于 Lysing enzymes 和蜗牛酶,Driselase 降解细胞壁的效率更高。然而在板栗疫病的转化中使用纤维素酶、溶菌酶和蜗牛酶酶解菌丝即可获得大量的原生质体^[30]。杨树炭疽病菌中仅用 Lysing enzymes 酶解即可获得大量的原生质体^[28]。不同真菌的细胞壁成分存在一定的差异,因此筛选其适用的细胞壁降解酶的种类也是制备原生质体的关键之一。

酶解过程中还发现,杨树腐烂病菌获得的原生质体直径为 6.63–21.95 μm ,直径差异较大,但 FDA 染色观察发现虽然原生质体直径差异较大,但均能保持完好形态且表现出较强绿色荧光,具有较高的活力。此外,葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)中酶解获得的原生质体直径为 6.72–32.35 μm ^[39],链霉菌(*Streptomyces clavuligerus*)中原生质体的直径为 1.02–5.40 μm ^[40],均存在类似的原生质体直径差异较大的现象。

综上所述,本研究在杨树腐烂病菌(*C. chrysosperma*)中首次成功建立了PEG介导原生质体的遗传转化体系,与苹果腐烂病菌(*V. mali*)相比,在增加原生质体产量的同时提高了转化效率,且该遗传体系的建立为研究杨树腐烂病菌的基因功能和致病机制提供了技术支持。

参考文献

- [1] Yang CJ, Wang YH. Pharmaceutical screening and control technology of poplar skin disease[J]. Forestry Science & Technology, 2010, 35(3): 27-29 (in Chinese)
杨春杰, 王云华. 杨树烂皮病药剂筛选及防治技术[J]. 林业科技, 2010, 35(3): 27-29
- [2] Kopley JB, Reeves FB, Jacobi WR, et al. Species associated with cytospora canker on *Populus tremuloides*[J]. Mycotaxon, 2015, 130(3): 783-805
- [3] Yuan BB, Cao ZM. Screening of biocontrol actinomycetes of *Valsa sordida* and study on bioactive metabolite[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2007, 35(4): 139-144 (in Chinese)
原犇犇, 曹支敏. 杨树腐烂病生防放线菌筛选及其活性产物研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(4): 139-144
- [4] Qu HH, Yang XQ, Jiang LX, et al. Researches of *Valsa sordida* nits[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2012(6): 145-149 (in Chinese)
曲辉辉, 杨晓强, 姜丽霞, 等. 杨树烂皮病研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2012(6): 145-149
- [5] Worrall JJ, Adams GC, Tharp SC. Summer heat and an epidemic of cytospora canker of *Alnus*[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2010, 32(3): 376-386
- [6] Liu SJ, Li DG, Yang WX, et al. The occurrence regularity and integrated control measures of poplar skin rot[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2012, 18(24): 111-112 (in Chinese)
刘书景, 李德桂, 杨文霞, 等. 杨树烂皮病发病规律与综合防治措施[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(24): 111-112
- [7] Ji RQ, Li Y, Song RQ, et al. Inhibition effect and mechanism of *Amanita virosa* on poplar skin rot[J]. Forest Pest and Disease, 2010, 29(6): 1-4 (in Chinese)
冀瑞卿, 李玉, 宋瑞清, 等. *Amanita virosa*对杨树烂皮病的抑制效果及其抑菌机理初探[J]. 中国森林病虫, 2010, 29(6): 1-4
- [8] Bloomberg WJ. Cytospora canker of poplars: factors influencing the development of the disease[J]. Canadian Journal of Botany, 1962, 40(10): 1271-1280
- [9] Li CW. Antifungal substances extracted from strain T-33 and its inhibiting mechanism on *Cytospora chrysosperma*[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2012 (in Chinese)
李冲伟. 菌株T-33抑菌活性物质及其对杨树烂皮病菌的抑制机理[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2012
- [10] Zhang XY, Lü Q, Liang J, et al. Scientific problems to be solved for forest protection in China[J]. Forest Pest and Disease, 2012, 31(5): 1-6,12 (in Chinese)
张星耀, 吕全, 梁军, 等. 中国森林保护亟待解决的若干科学问题[J]. 中国森林病虫, 2012, 31(5): 1-6,12
- [11] Liu ZH, Friesen TL. Polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation in filamentous fungal pathogens[A]//Bolton MD, Thomma BPHJ. Plant Fungal Pathogens[M]. New York: Humana Press, 2012: 365-375
- [12] Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984, 81(5): 1470-1474
- [13] Turgeon BG, Garber RC, Yoder OC. Development of a fungal transformation system based on selection of sequences with promoter activity[J]. Molecular and Cellular Biology, 1987, 7(9): 3297-3305
- [14] Rodriguez RJ, Yoder OC. Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f. sp. phaseoli (*Colletotrichum lindemuthianum*)[J]. Gene, 1987, 54(1): 73-81
- [15] Dobinson KF. Genetic transformation of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*[J]. Canadian Journal of Botany, 1995, 73(5): 710-715
- [16] Dobinson KF, Grant SJ, Kang S. Cloning and targeted disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*[J]. Current Genetics, 2004, 45(2): 104-110
- [17] Gao F, Zhou BJ, Li GY, et al. A glutamic acid-rich protein identified in *Verticillium dahliae* from an insertional mutagenesis affects microsclerotia formation and pathogenicity[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15319
- [18] Maruthachalam K, Klosterman SJ, Kang S, et al. Identification of pathogenicity-related genes in the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated T-DNA insertional mutagenesis[J]. Molecular Biotechnology, 2011, 49(3): 209-221
- [19] Wang YL, Xiao SX, Xiong DG, et al. Genetic transformation, infection process and qPCR quantification of *Verticillium dahliae* on smoke-tree *Cotinus coggygria*[J]. Australasian Plant Pathology, 2013, 42(1): 33-41
- [20] Xiong DG, Wang YL, Tian LM, et al. MADS-Box transcription factor *VdMcm1* regulates conidiation, microsclerotia formation, pathogenicity, and secondary metabolism of *Verticillium dahliae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1192
- [21] Xiong DG, Wang YL, Tian CM. Transcriptomic profiles of the smoke tree wilt fungus *Verticillium dahliae* under nutrient starvation stresses[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2015, 290(5): 1963-1977
- [22] Xiong DG, Wang YL, Tang CM, et al. *VdCrz1* is involved in microsclerotia formation and required for full virulence in *Verticillium dahliae*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 82: 201-212

- [23] Xiong DG, Wang YL, Deng CL, et al. Phylogenetic analysis revealed an expanded C₂H₂-homeobox subfamily and expression profiles of C₂H₂ zinc finger gene family in *Verticillium dahliae*[J]. *Gene*, 2015, 562(2): 169-179
- [24] Gao J, Li YB, Ke XW, et al. Development of genetic transformation system of *Valsa mali* of apple mediated by PEG[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(9): 1194-1199 (in Chinese)
高静, 李艳波, 柯希望, 等. PEG介导的苹果腐烂病菌原生质体转化[J]. *微生物学报*, 2011, 51(9): 1194-1199
- [25] Yin ZY, Ke XW, Li ZP, et al. Unconventional recombination in the mating type locus of heterothallic apple canker pathogen *Valsa mali*[J]. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 2017, 7(4): 1259-1265
- [26] Li SM. Establishment of double-stranded RNA-mediated gene silencing and characterization of *CgMEK1* in poplar anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides*[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Forestry University, 2013 (in Chinese)
李思蒙. 杨树炭疽病菌dsRNA介导基因沉默及CgMEK1功能分析[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2013.
- [27] Chen SY, Cao JW. Formation and regeneration of protoplasts from several filamentous fungi[J]. *Acta Mycologica Sinica*, 1986, 5(2): 117-123 (in Chinese)
陈淑滨, 曹军卫. 几种丝状真菌原生质体的形成与再生[J]. *真菌学报*, 1986, 5(2): 117-123
- [28] Li SM, Wang YL, Huang DH, et al. Establishment of a PEG-mediated genetic transformation system and expression of green fluorescence protein in *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2013, 49(5): 121-127 (in Chinese)
李思蒙, 王永林, 黄冬辉, 等. 杨树炭疽病菌原生质体遗传转化的建立及绿色荧光蛋白的表达[J]. *林业科学*, 2013, 49(5): 121-127
- [29] Churchill ACL, Ciuffetti LM, Hansen DR, et al. Transformation of the fungal pathogen *Cryphonectria parasitica* with a variety of heterologous plasmids[J]. *Current Genetics*, 1990, 17(1): 25-31
- [30] Chen MJ. The cloning and functional characterization of *cpsr1* and *cphyma* genes in *Cryphonectria parasitica*[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2007 (in Chinese)
陈美佳. 板栗疫病菌*cpsr1*基因与*cphyma*基因的克隆及其功能研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2007
- [31] Jiang CC, Qiu SS, Li CH. Optimization of protoplast formation, regeneration, and viability of myxobacteria[J]. *Advances in Chemical Science*, 2015, 4: 1-6
- [32] Gupta UG, Cheema GS, Sodhi HS, et al. Protoplast isolation and regeneration in *Agaricus bisporus* strain MS 39[J]. *Mushroom Research*, 1997, 6: 59-62
- [33] Kiguchi T, Yanagi SO. Intraspecific heterokaryon and fruit body formation in *Coprinus macrorhizus* by protoplast fusion of auxotrophic mutants[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1985, 22(2): 121-127
- [34] Zhang ZG. Fungal Protoplast Technique[M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 2003: 15-42 (in Chinese)
张志光. 真菌原生质体技术[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2003: 15-42
- [35] Wubie AJ, Hu Y, Li W, et al. Factors analysis in protoplast isolation and regeneration from a chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*[J]. *International Journal of Agriculture & Biology*, 2014, 16(1): 89-96
- [36] Xiao SX, Sun YJ, Tian CM, et al. Optimization of factors affecting protoplast preparation and transformation of smoke-tree wilt fungus *Verticillium dahliae*[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2013, 7(22): 2712-2718
- [37] Li Y, Yuan QP, Du XL. Protoplast from β -carotene-producing fungus *Blakeslea trispora*: preparation, regeneration and validation[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2008, 25(6): 1416-1421
- [38] Eyini M, Rajkumar K, Balaji P. Isolation, regeneration and PEG-induced fusion of protoplasts of *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus florida*[J]. *Mycobiology*, 2006, 34(2): 73-78
- [39] Chen L, Sun GW, Wang HK, et al. Protoplast preparation and *gfp* transformation of *Botryosphaeria dothidea*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2014, 50(6): 131-137 (in Chinese)
陈亮, 孙庚午, 王洪凯, 等. 葡萄座腔菌原生质体的制备及*gfp*的转化[J]. *林业科学*, 2014, 50(6): 131-137
- [40] Illing GT, Normansell ID, Peberdy JF. Protoplast isolation and regeneration in *Streptomyces clavuligerus*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1989, 135(8): 2289-2297