

# 平菇遗传转化的研究进展

刘洪博, 王宇光, 李兵 (中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101)

**摘要** 平菇是重要的食用担子菌之一, 具有广阔的研究应用前景。综述了近年来平菇遗传转化体系的研究进展。

**关键词** 平菇; 原生质体融合; 转化载体; 转化方法

**中图分类号** S646.1+4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)08-03152-03

Research Progress on Genetic Transformation of *Pleurotus ostreatus*

LIU Hong-bo et al (Institute of Tropical Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101)

**Abstract** *Pleurotus ostreatus* is one of the important edible fungi, and has wide prospect in research and application. The recent research of the genetic transformation system of *Pleurotus ostreatus* are reviewed.

**Key words** *Pleurotus ostreatus*; Protoplast fuse; Transformation vector; Transformation method

平菇是主要的栽培食用菌之一。目前已确知的有 50 种, 我国已知种有 29 种。它含有 11 对染色体, 大小为 1.4~4.7 Mb<sup>[1]</sup>。最近发现平菇含有产生酒精的关键酶——乙醇脱氢酶<sup>[2]</sup>, 引起了从事生物降解与生物质能源研究人员的极大兴趣。食用真菌的遗传转化研究虽然还处于不断探索阶段, 但对平菇的研究较其他食用菌深入。笔者对近年来平菇遗传转化的研究情况进行了综述。

## 1 平菇的遗传特性

目前, 平菇研究已由传统的生产、栽培、加工转向分子水平, 平菇基因工程研究不断发展与进步。平菇在生长初期会出现多核特点, 但很快又形成隔膜, 使每个细胞有一个核, 而且它具有易变异、种间或种内的异质等特点, 给遗传转化增加了一定难度。

## 2 平菇的遗传转化

### 2.1 通过原生质体融合进行遗传转化(不借助载体)

原生质体融合使两亲本菌株的同源或异源基因合在一起, 走上重组的第 1 步, 而转化提供了操纵单基因或来自已知基因的特殊 DNA 序列的机会<sup>[3]</sup>。灭活原生质体标记可以大大减少融合前对亲株进行遗传标记的工作量, 而且不易发生同源染色体融合。一般利用营养缺陷型和自然形态锁状联合标记, 但操作繁琐、工作量大, 且易损失亲本优良性状<sup>[4]</sup>。

菌丝在制备原生质体时常出现 3 种类型, 即无核、单核和双核原生质体<sup>[5]</sup>。香菇、佛罗里达侧耳、凤尾菇、金针菇等异宗结合食用菌的菌丝体, 在其原生质体制备过程中产生单核原生质体是一个普遍现象, 并认为双核体与单核体的比例为(0.85~2.34):1<sup>[6]</sup>。将香菇等 DNA 导入平菇单核原生质体, 利用平菇为四极性异宗结合食用菌的特性与基因互补原理也可以成功筛选出转化子<sup>[7]</sup>。以紫孢侧耳原生质体为受体, 将糙皮侧耳总 DNA 成功地导入其体内, 在具有“锁状联合”的双核转化株 T1 和 T2 中, 子实体均不释放孢子; T1 菌柄中生; T2 成熟子实体菌盖中部易长出菌丝, 转化率为  $8.2 \times 10^{-5}$  转化子/ $\mu\text{g}$  DNA, 转化比为 3.6%<sup>[8]</sup>。平菇、紫孢侧耳、香菇属间原生质体融合子再生第 5 代, 分析后发现, 融合子从双亲获得的遗传信息不等, 在世代延续中, 可能发生双亲 DNA 的互相排斥或单亲以及 DNA 丢失, 但有待进一步

研究证实<sup>[9]</sup>。

## 2.2 平菇载体转化

### 2.2.1 pAN7-1。Ming<sup>[10]</sup>

利用含有潮霉素抗性基因的载体 pAN7-1 转化糙皮侧耳的原生质体, 获得了转化子, 转化率为 5~46 转化子/ $\mu\text{g}$  DNA, 并建立了糙皮侧耳的转化系统。该载体融合了大肠杆菌潮霉素 B 转磷酸酶基因(hph)、*Aspergillus nidulans* 构巢曲霉的甘油-3-磷酸脱氢酶(gpd)启动子和色氨酸合成酶(TrpC)终止子序列<sup>[11-12]</sup>, 但选择抗性不稳定, 3~6 周后消失, 且重组质粒 pPO1 与 pPO2 在转化株中以额外的染色体组形式存在。

### 2.2.2 pLC-bar 和 pLC-GUS。Yanai-K 等<sup>[13]</sup>

利用构建的质粒 pLC-bar、pLC-GUS 进行平菇的转化试验, 他将含有香菇 priA 基因 3'-非编码区的 1.2 kb XbaI-EcoRI 片段插入 pUC19 相应位点, 构建质粒 pUTL。利用 PCR 技术从香菇 4.3 kb 的 DNA 片段中扩增出 2.5 kb 的 ras 基因并插入质粒 pUTL, 获得 pLC1。再把 pBlue-bar 0.5 kb 的抗除草剂基因连接到 pLC1 的 BamHI 位点, 得到 pLC-bar。质粒 pBI221 用 SacI 酶消化, 再连上 BamHI 接头, 得到 1.9 kb 的 E.coli GUS 基因片段, 插入 pLC1 的 BamHI 位点上得到 pLC-GUS。PEG、CaCl<sub>2</sub> 介导转化平菇原生质体, 筛选阳性克隆, 质粒 pLC-bar 转化率是 2 个转化子/ $\mu\text{g}$  质粒 DNA, 试验证明, 能稳定整合到宿主染色体组存在 3 个月, 部分发生了重排。pLC-GUS 试验通过 Southern blot 杂交分析表明, 有 2 个转化子表达 GUS 基因活性, 但是 GUS 蛋白表达相当低。

### 2.2.3 pLG-hph。质粒 pLG-hph<sup>[14]</sup>

是以 pUC19 为基础的重组质粒, 它包含 E.coli hph 基因, 以潮霉素 B 为选择抗性, 同时融合了 *L.edodes* GPD 的 1.0 kb 启动子和终止子序列, 目的序列被整合进宿主染色体。

### 2.2.4 pTM1。pTM1<sup>[15]</sup>

载体中含有萎锈灵真菌抗性表达基因, 克服了平菇对其他抗生素不敏感的特性, 是目前较成功的载体。由于平菇双核株 #261(ATCC66376)经紫外诱变后, 编码琥珀酸脱氢酶(EC1.3.99.1)硫铁蛋白(Ip)亚基的基因——Cbx<sup>R</sup> 的一个位点(CAC→CTC)发生突变, 使氨基酸序列由 His 变为 Leu, 从而具有了萎锈灵菌的抗性。试验先从平菇 #261-22 菌株中克隆了包含硫铁蛋白等位基因在内的 2.5kb 的片段, 该片段含有 sdi1 的 1.3 kb 的启动子区、189 bp 终止子区和 Apal 插入点。通过体外定点突变把含 sdi1 突变点 1.3 kb SmaI-SphI 片段克隆到质粒 pKF18k, 再

**作者简介** 刘洪博(1982-), 男, 吉林德惠人, 硕士研究生, 研究方向: 作物遗传育种。

**收稿日期** 2007-11-23

克隆回 pGEM-T, 成功构建了 pTM1 载体。

T.Irie 等用 pTM1 质粒重新构建表达载体 plpMg 和 plpMc, 重组具有平菇 sdi 表达信号下的 Mnp3(锰过氧化物酶 III), 共转化野生型平菇菌株, 获得一个重组株 TMG9-C1。在液体培养的早期, Mnp3 酶活性是野生型的数倍, 但最终分泌到胞外 Mnp3 活性与菌丝最初生长时期酶活性不相关。生长初期可能存在 Mnp3 产物的调控限制表达机制。该研究对用平菇表达重组蛋白将产生积极意义, 是世界首次报道表达重组基因的平菇重组菌株<sup>[6]</sup>。Takahisa Tsukihara 等于 2006 年用同样的载体重组同源超量表达 MnP2, 重组菌株 TM-218 产生 7 300 U/L (21 mg/L) 的 MnP2 酶, 菌丝生长初产量是先前结果的 30 倍, 相同条件下野生型却没有检测到 MnP2 活性, 但是重组菌株 TM-218 同样没有分泌到胞外。黄孢原毛平革菌表达 MnP 与 LiP 时也出现相似的情况<sup>[7]</sup>。

### 3 平菇启动子及筛选标记

目前平菇启动子的研究主要集中于强启动子和同源启动子。使用同源启动子不仅有利于调控因子的识别, 减少甲基化, 也有利于宿主细胞 RNA 聚合酶识别结合和转化效率的提高。

平菇的筛选标记主要有 2 种类型: 营养缺陷型标记和抗生素抗性标记。最常用的筛选标记是抗生素抗性标记。营养缺陷型食用菌菌株不容易得到且易产生回复突变, 目前已很少使用这种方法。自然抗药性标记在真菌中应用不多, 主要是真菌有较强的对抗细菌类抗菌素。潮霉素是一种广泛使用的抗菌素, 1992 年开始应用于平菇、蘑菇和香菇的抗性转化。香菇和平菇原生质体的融合试验中, 在含有潮霉素终浓度为 20  $\mu\text{g/ml}$  的融合子筛选培养基上, 共挑出 4 个菌落, 表明该法是可行的。原生质体融合一般利用营养缺陷型和自然形态锁状联合标记, 但是操作繁琐、工作量大且易损失亲本优良性状<sup>[8]</sup>。萎锈灵抗性作为一种平菇基因突变而具有的真菌选择标记, 已有成功转化的报道<sup>[9]</sup>。

### 4 平菇转化方法

**4.1 PEG 介导** PEG 能使细胞膜之间或 DNA 与膜之间形成分子桥, 促使细胞接触和粘连或是通过引起表面电荷紊乱, 干扰细胞间的识别而有利于细胞间的融合或外源 DNA 的进入。2006 年 Li 等<sup>[10]</sup>采用了 PEG 介导的高效平菇转化系统, 得到了 80~180 个整合了潮霉素 B 稳定抗性的克隆, 比以前的报道高 40~1 800 倍。1  $\mu\text{gDNA}/10$  个(7 个)再生原生质体, 整合了荧光蛋白基因的 100~150 个转化子散发绿色荧光, 但是 30 h 后消失了, 说明是瞬时表达。质粒 pAN7-1 曾被用来转化 *Ganoderma lucidum* 和 *Lentinus edodes*, 获得 120~150 与 85~100 个转化子/ $\mu\text{gDNA}/10$  个(7 个)再生原生质体, 分别是以前报道的 38 与 24~28 倍。这些数据表明, 新的 PEG 转化操作程序高效而且在平菇基因工程中是非常有用的工具。

**4.2 电激法** 原理是利用直流短电脉冲做可恢复性电击穿, 使原生质膜被击穿, 大分子得以穿过质膜和核膜, 外源 DNA 与受体 DNA 发生重组。一般认为, 当电场强度和时间的常数以一定方式组合而导致 60%~70% 的原生质死亡率时, 转化效率达到最高水平。电转化效率是用化学方法介导转化的 10~20 倍<sup>[20-21]</sup>。不同的食用菌, 最适电场强度不同, 在电容 25 F、阻抗 800  $\Omega$  条件下, 糙皮侧耳的最适脉冲电场强度

为 26~28 kV/cm, 时间为 10~14 ms。在电激处理时加入 PEG 并没有提高转化率, 电激法和 PEG 介导法的转化率相差不大, 但是电激法比 PEG 法操作更为简单方便且所需 DNA 量少, 适应范围广<sup>[22]</sup>。

**4.3 基因枪法** 该法是利用高速微弹把外源基因导入受体生物的完整细胞或组织中。使用时, 首先是外源质粒 DNA 与金属微粒(金粉或钨粉)混合, 使质粒 DNA 包裹在金属微粒的表面, 制成微弹, 然后再利用一定的压力装置将金属微弹高速射击, 击入受体细胞内进行转化。射击后的细胞或组织经过一定时间的恢复培养后, 再转移至选择培养基上选择转化子, 枪击的压力、质粒 DNA 的浓度及受体细胞的状态等因素对转化效果都有一定的影响。据报道, 基因枪法并不能有效提高转化效率, 但对于在实验室条件下不能良好培养或不能获得足够数量的再生原生质体的真菌有用。Masahide Sunagawa 等于 2002<sup>[23]</sup>年首次报道用基因枪法进行平菇尿嘧啶营养缺陷型原生质转化, 在 2 种不同的靶距和氮压条件下获得 5 个转化子, 转化率为 1 个转化子/ $\mu\text{g DNA}$ 。质粒 DNAs 被整合到基因组 DNA 并能稳定遗传。

**4.4 限制酶介导的 DNA 整合法(Restriction Enzyme Mediated DNA Integrati, REMI)** REMI 法是 20 世纪 90 年代发展起来的一种能较大幅度提高转化率的方法。该法的主要原理是, 限制性内切酶穿透细胞膜和核膜, 在特异的酶切位点活体切断染色体 DNA, 产生的染色体 DNA 末端会在宿主细胞酶系的作用下与限制性内切酶切断的线性化的质粒 DNA 相连接。该法可作为 REMI 标签对功能基因进行分离。2001 年, Irie<sup>[14]</sup>等以克隆载体 pLG-hph 转化 DNA, 获得了稳定的具有潮霉素抗性的转化子。该试验应用 REMI 法使转化率提高 10 倍, 约为 1 个转化子/10  $\mu\text{g pLG-hph}$ , 但随着酶用量的增加, 转化率反而下降。

### 5 结语

综上所述, 平菇以原生质球作为“感受态”, 以细菌转化所用的质粒为载体<sup>[24]</sup>进行物理化学方法转化, 成功得到了转化子; 潮霉素 B 抗性与含萎锈灵真菌抗性(克服了平菇对其他抗生素不敏感的特性)的 pTM1 载体在目前的试验中应用较多; 转化率在不同的试验中差别较大, 可见转化载体的研究及转化率的提高还有很大的空间。

### 参考文献

- [1] LUIS M L.GUMER P.MARIA, et al. Molecular karyotype of the white rot fungus *Plerotus ostreatus* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8): 3413-3417.
- [2] TOKUMITSU OKAMURA -MATSUI, TOMOMI TOMODA, SHOKO FUKUDA, et al. Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003(23): 133-144.
- [3] 李东屏. 原生质体技术[M]. 长沙: 湖南科技出版社, 2005: 132.
- [4] 范雷法, 潘慧娟. 食用菌属间原生质体融合研究初报[J]. *中国食用菌*, 2005, 24(5): 21-27.
- [5] PEBERDY J F. Protoplast technology and edible mushroom[C]//上海市农业科技信息研究所. 上海国际食用菌遗传育种讨论会文选. 上海, 1991.
- [6] 潘迎捷, 廖汉泉, 张树庭, 等. 异宗结合食用菌的原生质体单核化[J]. *上海农业学报*, 1993, 9(2): 1-5.
- [7] 贾建航, 刘振岳, 李小兵. 香菇 DNA 导入平菇原生质体及转化子鉴定研究[J]. *食用菌学报*, 1997, 4(4): 5-10.
- [8] 燕克勤, 朱宝成, 赵会良, 等. 电击法介导的紫孢侧耳原生质体转化[J]. *生物工程学报*, 1996, 12(1): 40-44.
- [9] 刘国振, 刘振岳, 贾建航, 等. 用 RAPD 方法对平菇、香菇属间原生质

体融合子的研究[J].遗传,1995,17(5):37-40.

- [10] MING P.Improve conditions for transformation of *Pleurotus ostreatus*[J].Applied Microbiol Biotechnol,1993,40:101-106.
- [11] LEMKE P A,PENG M.Genetic manipulation of fungi by DNA-mediated transformation[M]//KÜCK U.The mycota II: genetics and biotechnology.New York:Springer,Berlin Heidelberg,1995:109-139.
- [12] PENG M,SINGH N K,LEMKE P A.Recovery of recombinant plasmids from *Pleurotus ostreatus* transformants [J].Curr Genet,1992,22:53-59.
- [13] YANAI K,USAMI H.The integrative transformation of *Pleurotus ostreatus* using bialaphos resistance as a dominant selectable marker[J].Biosci Biotech Biochem,1996,60(3):472-475.
- [14] IRIE T,HONDA Y,HIRANO T.Stable transformation of *Pleurotus ostreatus* to hygromycin B resistance using *Lentinus edodes* GPD expression signals[J].Appl Microbiol Biotechnol,2001,56:707-709.
- [15] HONDA Y,MATSUYAMA T,IRIE T.Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus* [J].Curr Genet,2000,37:209-212.
- [16] IRIE T,HONDA Y,WATANABE T,et al.Homologous expression of recombinant manganese peroxidase genes in ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*[J].Appl Microbiol Biotechnol,2001,55:566-570.
- [17] TAKAHISAA TSUKIHARA,HONDA Y,RYOTA SAKAI,et al.Exclusive overproduction of recombinant versatile peroxidase MnP2 by genetically modified white rot fungus,*Pleurotus ostreatus*[J].Journal of Biotechnology,2006(126):431-439.
- [18] KIM B G,MAGAE Y,YOU Y B,et al. Isolation and transformation of uracil auxotrophs of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*[J].FEMS Microbiol Lett,1999,181(2):225-228.
- [19] LI G,LI R,LIU Q.A highly efficient polyethylene glycol-mediated transformation method for mushrooms [J].FEMS Microbiol Lett,2006,256(2):203-208.
- [20] THIERRY NOEL,JECQUES LABARERE,HOMOLOGOUS.Transformation of the edible basidiomycete *Agrocybe aegerita* with the URA1 gene: characterization of integrative events and of rearranged free plasmids in transformants [J].Curr Genet,1994,25: 432-437.
- [21] SAMBROOK J,FRISTSCH E F,MANIATIS T.Molecular cloning—A laboratory manual[M].New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989:50.
- [22] PENG M,LEMKE PAUL A,SHAW JCEAZPH J.Improved conditions for protoplast formation and transformation of *Pleurotus ostreatus* [J].Applied Microbiology and Biotechnology,1993,40(1):101-106.
- [23] MASAHIDE SUNAGAWA,YUMI MAGAE.Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment[J].FEMS Microbiology Letters,2002,211(2):143-146.
- [24] 唐国敏.丝状真菌基因表达系统研究进展[J].真菌学报,1992,11(2):81-82.

(上接第 3146 页)

和其保持系 G46B 酯酶同工酶、过氧化物酶同工酶、细胞色素氧化酶同工酶酶带的分布、强度、数目差异十分明显,主要表现在单核期不育系 3 种同工酶酶带数目的减少上。这种现象与细胞学观察的 G46A 单核期孢子体败育是一致的,说明这些差异能反映出不育系败育的生理生化变化。

酯酶同工酶在作物杂种优势及雄性不育研究中广泛应用,但其通过何种途径导致雄性不育目前还没有报道。从该试验结果来看,无论在叶片还是幼穗中,不同时期不育系比保持系酯酶同工酶酶谱的差异更显著,均是从花粉母细胞期开始一直持续到三核期,但这又与细胞学观察的 G46A 单核期孢子体败育不一致。这可能与酯酶同工酶具有广泛的作用途径有关。因此,若将酯酶同工酶作为同核异质雄性不育系败育的特征指标还需进一步的研究。

细胞色素氧化酶同工酶是线粒体内膜的标志酶,是电子传递链末端的氧化酶,不育系 G46A 单核期败育可能是由于幼穗中 1 条酶带的缺失造成能量代谢受阻,从而导致小孢子无法正常发育所致。过氧化物酶同工酶导致胞质雄性不育有以下 2 种观点:一种观点是酶能氧化分解生长素 IAA,不育系幼穗中过氧化物酶同工酶活性比正常保持系有较大提高,从而导致幼穗花药中自由 IAA 含量下降,最终造成生长素亏损导致花药不育<sup>[3]</sup>;另一种观点是雄性不育与生殖器官中的膜脂过氧化作用密切相关,不育系幼穗中过氧化物酶同工酶组份和活性骤然下降或减少,必然清除不了过多的活性氧,进而引起一系列的败育过程,导致雄性不

育的发生<sup>[4]</sup>。该试验结果支持了第 2 种观点。综上所述,笔者认为可以将细胞色素氧化酶同工酶及过氧化物酶同工酶特征酶带的缺失作为胞质雄性不育系败育的生理生化指标。

#### 参考文献

- [1] 李大东,王斌.水稻线粒体 *atpA* 基因的克隆及其与细胞质雄性不育的关系[J].遗传,1990,12(4):1-4.
- [2] 李继耕.细胞质雄性不育性的分子机理[J].遗传,1992,4(2):37-40.
- [3] 梅启明,朱英国.红莲型和野败型水稻细胞质雄性不育系线粒体 DNA (mDNA) 的比较研究[J].武汉植物学研究,1990,8(1):25-33.
- [4] ARAGE A,BEGU D,LITVAK S.RNA editing in plants[J].Physical Plant,1994,91:543-550.
- [5] APSIT V J,NAKAMURA R R,WHEELER N C.Differential male reproductive success in maize [J].Theor Appl Genet,1989,77:681-684.
- [6] 王喜忠,扬玉华.群体遗传学原理[M].成都:四川大学出版社,1992:88-91.
- [7] 王中仁.植物遗传多样性和系统学研究中的等位酶分析[J].生物多样性,1994,2(1):38-43.
- [8] 刘忠松,李红,顾凯,等.水稻细胞质雄性不育系类型的细胞质效应[J].植物生理学通讯,1987,2(2):16-21.
- [9] 胡能书,万国贤.同工酶技术及其应用[M].湖南:湖南科学技术出版社,2002.
- [10] 王中仁.植物等位酶分析[M].北京:科学出版社,1996:10-36.
- [11] 吴文瑜,肖翊华.水稻不育系和保持系在幼穗分化期的同工酶和氨基酸的变化[J].武汉大学学报,1992,3(17):102-106.
- [12] 杨继华,陈燕珍.同核异质雄性不育水稻的酯酶同工酶分析[J].广西师范大学学报,1994,1(12):69-75.
- [13] 周涵韬,郑文竹,梅启明,等.水稻细胞质雄性不育系小孢子发育过程中的同工酶分析[J].厦门大学学报,2000,5(39):676-681.
- [14] 傅军如,徐安庆,贺浩华,等.萍乡显性核不育水稻不育株与可育株同工酶比较分析[J].江西农业大学学报,2005,5(27):641-647.