

金针菇尿嘧啶营养缺陷型菌株的筛选与分子鉴定

卢绪志^{1,2}, 万佳宁¹, 茅文俊¹, 杨瑞恒¹, 王瑞娟¹, 鲍大鹏^{1,*}

(¹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, 上海市农业遗传育种重点开放实验室, 上海 201403; ²上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 选用对 5-氟乳清酸 (5-FOA) 敏感的金针菇单核菌株 ‘DG1-1’ 作为供试菌株, 对其原生质体采用功率为 10 W 的紫外光进行垂直距离 15 cm 照射 12 s 的诱变处理, 利用含有 5-FOA 和尿嘧啶的筛选培养基筛选获得了 3 株稳定的尿嘧啶营养缺陷型突变菌株 ‘NG1-65’、‘NG1-92’ 和 ‘NG1-95’。通过对尿嘧啶合成代谢途径中的 *pyrF* 和 *pyrG* 基因的分子检测发现, ‘NG1-65’ 菌株的 *pyrF* 基因第 39 位和 40 位碱基之间插入 T, ‘NG1-92’ 菌株的 *pyrG* 基因第 236 位碱基 T 突变为 C, ‘NG1-95’ 菌株的 *pyrF* 基因第 104 位碱基 C 突变为 T, 这些插入突变和点突变可能导致基因编码的蛋白功能失去活性, 产生尿嘧啶营养缺陷型。金针菇尿嘧啶缺陷型菌株可以为金针菇遗传转化体系的构建提供材料。

关键词: 金针菇; 尿嘧啶营养缺陷型; *pyrF* 基因; *pyrG* 基因

中图分类号: S 646.1⁺⁵

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 03-0495-09

Screening and Molecular Verification of Uracil Auxotrophic Mutants of *Flammulina velutipes*

LU Xuzhi^{1,2}, WAN Jianing¹, MAO Wenjun¹, YANG Ruiheng¹, WANG Ruijuan¹, and BAO Dapeng^{1,*}

(¹Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture; National Engineering Research Center of Edible Fungi; Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai, Shanghai 201403, China; ²College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Flammulina velutipes* is one of the most popular edible mushroom species in the world. In this study, 3 uracil auxotrophic mutants ‘NG1-65’, ‘NG1-92’ and ‘NG1-95’ were obtained from the monocaryon 5-fluoroorotic acid (5-FOA) -sensitive *F. velutipes* strain ‘DG1-1’ by UV irradiation. UV mutagenesis was conducted under the conditions as following: an irradiation intensity of 10 W, irradiation distance of 15 cm and irradiation time of 12 s. The mutants could grow well in MM media containing 0.05 mmol · L⁻¹ uridine and 0.5 g · L⁻¹ 5-FOA, but could not grow on MM medium without uridine. PCR analyses revealed that two critical genes *pyrF* and *pyrG* in the uridine biosynthetic pathway were disrupted in mutants, probably resulting in the inactivation of related proteins. The survey of the mutation sites

收稿日期: 2017-01-10; **修回日期:** 2017-03-13

基金项目: 上海市科学技术委员会工程技术研究中心能力提升项目 (16DZ2281300); 上海市农业科学院科技发展基金项目 (沪农引才 2016 第 001 号)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: 1610301025@qq.com)

suggested that a 'T' inserted the site between the 39th and 40th base of *pyrF* in strain 'NG1-65' and the 104th base 'C' was changed into 'T' of *pyrF* in strain 'NG1-95'. The mutant T→C at the site of 236th base was critical to inactive of *pyrG* in strain 'NG1-92'. The uracil auxotrophs of *F. velutipes* could be used as a tool for genetic transformation study and strain source identification.

Keywords: *Flammulina velutipes*; ueacil auxotroph; *pyrF*; *pyrG*

金针菇 [*Flammulina velutipes* (Fr.) Singer] 含有丰富的营养成分以及多糖等多种活性物质 (伍明等, 2011; 王雅琪等, 2012), 是中国重要的栽培食用菌之一, 据中国食用菌协会统计, 2015 年度中国金针菇总产量达到 275.5 万 t, 具有广阔的开发应用前景。

目前金针菇全基因组测序工作已经完成 (曾旭等, 2015), 为金针菇分子遗传学的研究提供了基础, 但在其遗传学研究中, 还缺少成熟高效的遗传转化体系, 这大大限制了分子遗传学相关深入研究工作的开展。丝状真菌的遗传转化体系构建中, 有多种技术可供选择, 如 PEG 介导转化法、农杆菌介导转化法、基因枪法等。其中 PEG 介导的转化方法虽然转化率略低, 但不需要昂贵的仪器和限制性内切酶, 是一种经济、简便的转化方法。PEG 介导的转化方法已应用于香菇 (Sun et al., 2001)、双孢蘑菇 (van de Rhee et al., 1996)、平菇和草菇 (de Groot et al., 1998) 等食用菌的转化; 在 PEG 介导的转化技术体系中需要使用遗传标记, 而遗传标记有多种方法, 如营养缺陷型标记、抗生素抗性标记和代谢产物抗性标记等。营养缺陷型筛选标记不管是从获得的转化效果, 还是从获得的转基因食用菌的生物安全性方面来考虑, 都是一种很好的筛选标记。金针菇作为一种深受消费者欢迎的食用菌品种, 在遗传转化研究过程中, 采用营养缺陷型标记对于消费者具有更高的安全性。

常见的营养缺陷型菌株的筛选标记有腺嘌呤、蛋氨酸、尿嘧啶、色氨酸、核菌素、精氨酸、亮氨酸、脯氨酸和肌醇等 (王丕武等, 2001)。营养缺陷型标记基因 *Ural* (二氢乳清酸)、*Pabl* (*p*-氨基苯甲酸)、*trp3* (色氨酸) 等已被报道应用于杨树菇 *Agrocybe aegerita* (Noel & Labarere, 1994)、灰盖鬼伞 *Coprinus cinereus* (Granado et al., 1997) 和双孢蘑菇 *Agaricus bisporus* (Miranda et al., 1996) 的遗传转化。

尿嘧啶缺陷型菌株是分子生物学试验中一种常见的营养缺陷型菌株, 在尿嘧啶从头合成途径中, 常常由于 *pyrF* 基因编码的乳清酸磷酸核糖转移酶 (OPRT) 或 *pyrG* 基因编码的乳清苷 - 5' - 磷酸脱羧酶 (OMPDC) 发生突变 (O'Donov & Neuha, 1970; 鲍大鹏等, 2009), 不能正常合成尿嘧啶, 同时也不能使 5 - 氟乳清酸 (5-FOA) 形成有毒物质 5 - 氟尿嘧啶核苷酸, 从而具有 5-FOA 抗性; 而正常菌株生长中会催化 5-FOA 生成有毒性的 5 - 氟尿嘧啶核苷酸, 从而使生长受到抑制; 加入尿嘧啶和 5-FOA 的培养基可以用于尿嘧啶营养缺陷型菌株的筛选 (Kondo et al., 1991)。利用尿嘧啶营养缺陷型标记在细菌、丝状真菌、酵母菌中已成功获得营养缺陷性菌株, 如超嗜热古菌 *Sulfolobus tokodaii* (黄奇洪等, 2008)、里氏木霉 *Trichoderma reesei* (闫作梅等, 2011)、海洋红酵母 *Rhodotorula benthica* (王宇光等, 2010)、卷枝毛霉 *Mucor circinelloides* (张映瞳等, 2016)、假丝酵母 *Candida versatilis* 和鲁氏酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* (赵秀丽等, 2016)。但在食用菌中目前只有关于香菇 *Lentinula edodes* 尿嘧啶营养缺陷性菌株的报道 (王连会等, 2014)。

本研究中以金针菇为材料, 通过紫外诱变方法获得尿嘧啶营养缺陷型菌株, 并从基因水平对突变株尿嘧啶代谢路径中的关键基因 *pyrF* 与 *pyrG* 进行了分子鉴定, 为进一步建立金针菇遗传转化体系提供材料。

1 材料与amp;方法

1.1 材料及其培养基

供试金针菇单核菌株‘DG1-1’和‘DG1-29’由上海市农业科学院食用菌研究所菌种保藏中心提供。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 马铃薯 200 g (去皮), 水煮后过滤, 滤液加葡萄糖 20 g, 琼脂粉 15 g, 加水至 1 L, 灭菌, 制作平板, 供菌丝活化与菌丝培养使用。马铃薯葡萄糖液体培养基(PD): PDA 培养基不加琼脂粉, 定容后分装在 250 mL 的三角瓶中, 每瓶 100 mL, 灭菌, 供菌丝培养。基本培养基(MM): KH_2PO_3 1.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g, Thiamine HCl 500 μg , 琼脂粉 15 g, 加水至 1 L, 灭菌。原生质体再生培养基(OPDA): PDA 培养基中添加 *D*-甘露醇 110 g, 灭菌后制作平板备用。

1.2 原生质体制备及再生

菌种接种于 PD 液体培养基中, 25 $^\circ\text{C}$ 培养 7 d 后过滤收集菌丝, 加入 1.5% 的溶壁酶(广东微生物研究所, 广州), 30 $^\circ\text{C}$ 、70 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下在摇床上酶解 4 h。用砂芯漏斗过滤酶解液, 滤液在 4 $^\circ\text{C}$ 下 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。弃上清液, 0.6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇重悬, 4 $^\circ\text{C}$ 下 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后弃上清液, 此步骤重复 1~2 次。最后在原生质体细胞沉淀中加入适量的 0.6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇混匀, 用血球计数板计数并计算原生质体密度(个 $\cdot \text{mL}^{-1}$)。

稀释后的原生质体细胞溶液涂布在 OPDA 平板再生培养基上, 25 $^\circ\text{C}$ 培养 7 d 后观察原生质体细胞再生情况, 记录再生菌落数。

1.3 金针菇单核菌株对 5-FOA 的敏感性与抗性试验

2015 年 11 月 20 日开始将供试金针菇菌株的菌丝分别接种到不同浓度的 5-FOA (0、0.01、0.03、0.05、0.1、0.2 和 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 PDA 平板上, 25 $^\circ\text{C}$ 下培养 7 d, 观察并测量菌落在平板上的生长半径, 每个浓度 3 次重复。

1.4 金针菇原生质体细胞紫外致死试验

将原生质体细胞溶液稀释到 10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 取 100 μL 均匀涂布到再生培养基 OPDA 平板上, 以功率为 10 W 的紫外光垂直照射(距离 15 cm) 平板表面, 照射时间分别为 0、5、10、15、20、25 和 30 s, 每个紫外照射时间 3 次重复。25 $^\circ\text{C}$ 下避光培养 7 d 后, 观察原生质体细胞再生情况, 记录再生菌落数。

1.5 金针菇原生质体诱变与营养缺陷型突变株的筛选验证

原生质体细胞溶液分别涂布到再生培养基(OPDA)、添加尿嘧啶(0.05 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的再生培养基(OPDU)、添加尿嘧啶(0.05 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 5-FOA (0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的再生筛选培养基(OPDUF) 上, 每个平板 100 μL 。每种涂布后的平板取 3 个重复不照射作为对照, 其余涂布在 OPDUF 平板上, 紫外照射 12 s。25 $^\circ\text{C}$ 下避光培养两周, 观察菌落的再生数。

挑取 OPDUF 上生长的单菌落, 转接到添加尿嘧啶(0.05 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 5-FOA (0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 PDA 培养基平板上, 25 $^\circ\text{C}$ 下培养 7 d 后, 挑取菌块分别接种到基本培养基(MM)、添加尿嘧啶(0.05

mmol · L⁻¹) 的加富培养基 (MMU)、添加尿嘧啶 (0.05 mmol · L⁻¹) 和 5-FOA (0.5 g · L⁻¹) 的鉴别培养基 (MMUF) 上进行表型验证培养, 同时以 ‘DG1-1’ 菌株作对照, 重复 2 次。25 °C 下培养 7 d 后, 观察初筛突变菌株与 ‘DG1-1’ 菌株相比是否具有 5-FOA 抗性。

对两次验证试验都表现为尿嘧啶营养缺陷型的菌株, 在 MMU 培养基上传代 5 次, 再次接种到 MM、MMU 及 MMUF 培养基平板上进行表型验证培养, 并以 ‘DG1-1’ 菌株作对照。25 °C 下培养 7 d 后观察是否出现突变回复现象与假阳性。将筛选得到的尿嘧啶营养缺陷型菌株和 ‘DG1-1’ 菌株分别接种到 MM、MMU 及 MMUF 培养基平板上, 25 °C 下培养 7 d, 观察并测量菌落在平板上的生长半径, 每种培养基 3 次重复。

1.6 金针菇突变菌株基因组 DNA 的提取与尿嘧啶营养缺陷型分子鉴定

采用 CTAB 法 (杨华和李联泰, 2003) 提取 ‘DG1-1’ 菌株和突变菌株基因组 DNA。根据金针菇基因组信息设计 *pyrF* (GenBank 登录号: KY401433) 和 *pyrG* (GenBank 登录号: KY401432) 的引物, 用于鉴定尿嘧啶营养缺陷型菌株的基因型 (表 1)。

表 1 扩增 *pyrF* 和 *pyrG* 基因的 PCR 引物
Table 1 The primers to amplify *pyrF* and *pyrG* genes

基因名称 Gene name	引物名称 Primers	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
<i>pyrF</i>	G1F8F	TAATGGGATTCGGGTTTC
	G1F8R	TCTCGCCAACCTTGATTTA
<i>pyrG</i>	Fv5nwholeF	TCTACTATCCATTGCGCTACT
	Fv5nwholeR	CGACTTCGAATGGCTTCAAAG

PCR 扩增体系 50 μL, 包含 *Pfu* DNA Polymerase (生工生物工程股份有限公司, 上海) 0.5 μL (5 U · μL⁻¹), 10 × PCR Buffer 5 μL (Mg²⁺ Plus), dNTP Mixture 5 μL (2 mmol · L⁻¹), 模板 DNA 1 μL (100 ng · μL⁻¹), 引物各 1 μL, 双蒸水 36.5 μL。PCR 反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 ~ 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保藏。

PCR 产物进行克隆测序。对测得的基因序列用 DNAMAN 软件进行碱基序列比对和限制性酶切位点分析, 确定尿嘧啶营养缺陷型菌株是否产生基因突变以及突变是否导致限制性酶切位点的变化。将出发野生型菌株与酶切位点发生变化的突变菌株的 PCR 产物纯化回收后, 利用相应的酶进行酶切, 回收, 琼脂糖凝胶电泳, 观察突变菌株的基因酶切片段与出发野生型菌株相比是否发生相应的变化。

2 结果与分析

2.1 金针菇单核菌株菌丝体对 5-FOA 的敏感性试验

培养 7 d 发现, 在不含 5-FOA 的 PDA 培养基上, 菌株 ‘DG1-1’ 的菌落生长半径显著高于菌株 ‘DG1-29’, 随着 PDA 培养基中 5-FOA 浓度的逐渐增加, 两个菌株的菌落生长半径都逐渐变小, 表明菌丝生长受到 5-FOA 的抑制 (图 1); 但 ‘DG1-1’ 菌落生长半径的下降幅度明显高于 ‘DG1-29’, 当 5-FOA 为 0.1 g · L⁻¹ 时, ‘DG1-1’ 菌株的菌落生长半径显著低于菌株 ‘DG1-29’, 这表明 ‘DG1-1’ 对 5-FOA 有更高的敏感性。

在进一步的试验中, 选用菌株 ‘DG1-1’ 作为紫外诱变的出发菌株, 并选用其生长完全受到抑制的 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5-FOA 浓度 (图 1) 作为筛选浓度。

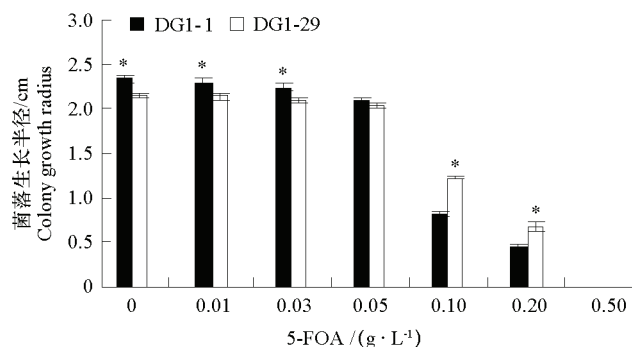


图 1 金针菇供试菌株对 PDA 培养基 5-FOA 的敏感性试验

* 表示该组菌株间差异显著。

Fig. 1 The sensitivity test of *Flammulina velutipes* strains on 5-FOA

Asterisks show the colony growth radius respectively significant difference between two strains.

2.2 金针菇 ‘DG1-1’ 菌株原生质体紫外致死试验

‘DG1-1’ 菌株原生质体细胞在再生平板培养基 (OPDA) 上的再生率 (萌发菌落数/涂布细胞个数) 为 2.89%。随着紫外照射时间的逐渐增加, 原生质体的萌发量逐渐降低, 紫外照射 25 s 时原生质体相对萌发率为 0 (图 2)。根据原生质体紫外照射相对萌发率曲线, 计算出原生质体相对萌发率为 50% 的半致死紫外照射时间为 11.38 s。基于此, 选择 12 s 作为紫外光诱变原生质体的照射时间。

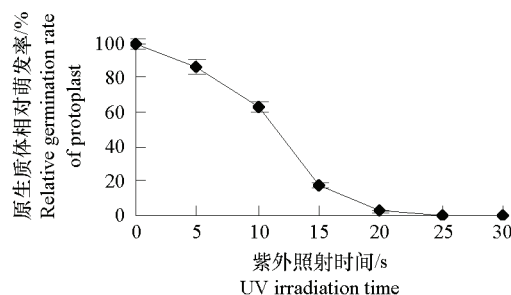


图 2 金针菇 ‘DG1-1’ 菌株原生质体在紫外照射下的相对萌发率

Fig. 2 Relative germination rate of the protoplast of *Flammulina velutipes* ‘DG1-1’ strain under treatment with UV irradiation

2.3 金针菇尿嘧啶营养缺陷型菌株的筛选和验证

金针菇 ‘DG1-1’ 菌株原生质体在再生培养基 (OPDA)、添加尿嘧啶 ($0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的再生培养基 (OPDU) 正常再生, 菌落大量出现, 两者并无明显差异, 在添加尿嘧啶 ($0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 5-FOA ($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的再生筛选培养基 (OPDUF) 上原生质体再生受到明显抑制, 仅有极少量菌落出现。大量的 ‘DG1-1’ 原生质体紫外照射后, 在 OPDUF 培养基上鉴别再生培养, 共获得的诱变菌株 102 株。经过两次筛选平板培养基筛选及 5 次传代稳定试验, 在排除假阳性和易回复突变菌株后, 最终共获得 3 株尿嘧啶营养缺陷型突变菌株 ‘NG1-65’、‘NG1-92’ 和 ‘NG1-95’。观察突变

菌株与菌株 ‘DG1-1’ 在不同培养基上的菌落大小 (图 3): ‘NG1-65’、‘NG1-92’ 和 ‘NG1-95’ 在 MM 培养基上生长受到抑制, 在 MMU、MMUF 培养基上能够正常生长; 而 ‘DG1-1’ 在 MM、MMU 培养基上能够正常生长, 在 MMUF 培养基上生长受到抑制。

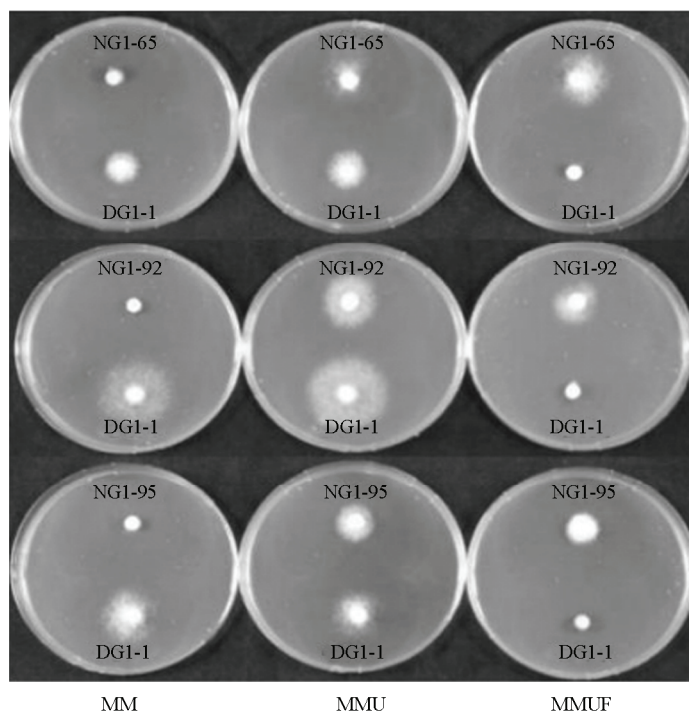


图 3 金针菇野生型 ‘DG1-1’ 菌株及其突变株 ‘NG1-65’、‘NG1-92’ 和 ‘NG1-95’ 在 MM、MMU 和 MMUF 培养基上的生长情况
 Fig. 3 The growth of auxotrophic strains ‘NG1-65’, ‘NG1-92’, ‘NG1-95’ and wild type strain ‘DG1-1’ of *Flammulina velutipes* on MM, MMU and MMUF medium

如图 4 所示, 25 °C 下培养 7 d, ‘DG1-1’ 在 MMUF 培养基上的菌落生长半径为 0, 而在 MM、MMU 培养基上菌落生长半径显著提高; ‘NG1-65’、‘NG1-92’ 和 ‘NG1-95’ 在 MM 培养基上菌落生长半径较小, 但在 MMU、MMUF 培养基上菌落生长半径显著提高, 表明菌株 ‘NG1-65’、‘NG1-92’ 和 ‘NG1-95’ 对 5-FOA 具有抗性, 而菌株 ‘DG1-1’ 对 5-FOA 不具有抗性。

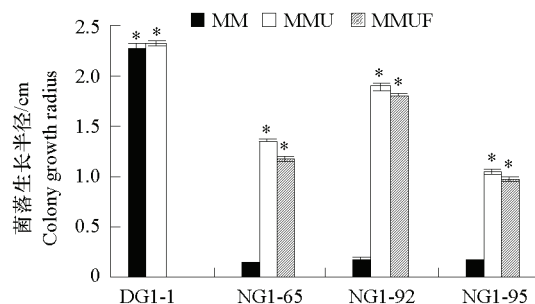


图 4 金针菇野生型 ‘DG1-1’ 菌株及其突变株 ‘NG1-65’、‘NG1-92’ 和 ‘NG1-95’ 在 MM、MMU 和 MMUF 培养基上的菌落生长半径

Fig. 4 The colony growth radius of auxotrophic strains ‘NG1-65’, ‘NG1-92’, ‘NG1-95’ and wild type strain ‘DG1-1’ of *Flammulina velutipes* on MM, MMU and MMUF medium

2.4 金针菇尿嘧啶营养缺陷型菌株的分子鉴定

对‘DG1-1’菌株及其3株尿嘧啶营养缺陷型变异菌株(‘NG1-65’、‘NG1-92’和‘NG1-95’)的尿嘧啶合成代谢路径中的 *pyrF* 和 *pyrG* 基因进行测序分析后发现:‘NG1-65’菌株的 *pyrF* 基因第39位和40位碱基之间插入了T,这可能导致 *pyrF* 编码的乳清酸磷酸核糖转移酶氨基酸序列第13位氨基酸后的编码混乱, *pyrG* 基因未发生突变;‘NG1-92’菌株的 *pyrG* 基因第236碱基T突变为C,这可能导致 *pyrG* 编码的乳清苷-5'-磷酸脱羧酶氨基酸序列第63位氨基酸L突变为P(CTC→CCC), *pyrF* 基因未发生突变;‘NG1-95’菌株的 *pyrF* 基因第104位碱基C突变为T,这可能导致 *pyrF* 编码的乳清酸磷酸核糖转移酶氨基酸序列第35位氨基酸S突变为L(TCA→TTA), *pyrG* 基因未发生突变。

对‘DG1-1’菌株及其3株尿嘧啶营养缺陷型菌株发生突变的 *pyrF* 和 *pyrG* 基因用 DNAMAN 软件进行限制性酶切位点对比分析发现,菌株‘NG1-92’ *pyrG* 基因第236位碱基突变引起 *Xho* I 酶(识别序列:5'C[^]TCGAG 3')在235位碱基之后的限制性酶切位点丢失,导致相邻两个酶切片段合为一段,长度增加48 bp,由177 bp变为225 bp(图5)。

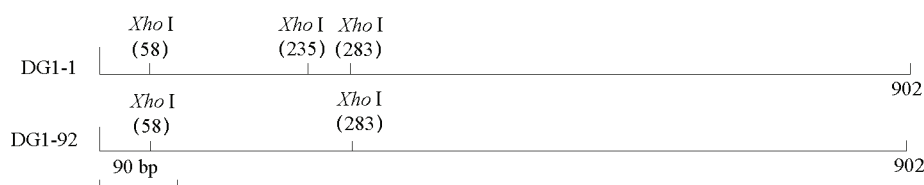


图5 金针菇野生型‘DG1-1’和突变株‘NG1-92’ *pyrG* 基因的 *Xho* I 酶限制性酶切位点
Fig. 5 Restriction sites map of *pyrG* gene in ‘NG1-92’ and ‘DG1-1’ cut by *Xho* I

对菌株‘DG1-1’和‘NG1-92’ *pyrG* 基因的PCR产物纯化回收后,利用 *Xho* I 酶酶切,将回收后的产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果(图6)表明,菌株‘NG1-92’的 *pyrG* 基因相邻两个 *Xho* I 酶的酶切片段合并为一段,根据片段的大小推测为基因序列第235位碱基之后的 *Xho* I 酶限制性酶切位点丢失。

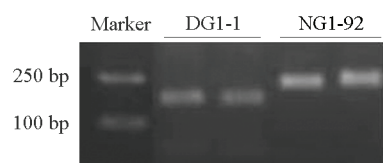


图6 金针菇野生型‘DG1-1’和突变株‘NG1-92’
pyrG 基因 *Xho* I 酶酶切
Fig. 6 Electrophoresis images of *pyrG* gene in ‘NG1-92’
and ‘DG1-1’ cut by *Xho* I

3 讨论

通过试验确定了筛选金针菇尿嘧啶营养缺陷型菌株的合适条件,筛选再生培养基中5-FOA的浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,诱变条件为功率10 W的紫外光,辐照距离为15 cm,照射时间为12 s。通过两次表型筛选后获得的3株金针菇尿嘧啶营养缺陷型菌株,经连续传代培养5次以上,未出现回复突变现象。分子验证表明,这些突变菌株尿嘧啶合成途径中的关键基因 *pyrF* 或 *pyrG* 发生了插入突变或点突变,这些突变可能引起了相应氨基酸序列发生变化,从而导致尿嘧啶合成能力丧失。

安莉颖等(2014)通过常温常压等离子体(ARTP)诱变和5-FOA筛选获得1株里氏木霉

(*Trichoderma reesei*) RutC30 *pyrG* 基因发生突变的尿嘧啶营养缺陷型菌株; 王宇光等 (2010) 通过紫外诱变获得 18 株海洋红酵母 (*Rhodotorula benthica*) S8 的尿嘧啶营养缺陷型菌株, 并且有 16 株能够稳定遗传; 食用菌中目前只有王连会等 (2014) 利用紫外线诱变和 5-FOA 筛选获得了 18 株香菇 (*Lentinula edodes*) L26 的尿嘧啶缺陷型, 其中 8 株发生了尿嘧啶合成途径中的关键基因突变。本研究中金针菇尿嘧啶营养缺陷型菌株同样可以通过紫外光诱变获得, 但是最终获得的稳定突变菌株数较少, 这与其他菌株的尿嘧啶营养缺陷型菌株的诱变筛选试验结果相似, 导致这种情况的原因可能是: 食用菌原生质体再生率较低, 需要大量制备原生质体, 以提高原生质体再生菌株的基数; 存在假阳性和基因突变回复现象, 虽然诱变试验获得大量诱变菌株, 但是在稳定性检测中, 很多诱变菌株都恢复为野生型, 其原因值得进一步研究。

金针菇尿嘧啶营养缺陷型菌株的获得为今后开展遗传转化研究、菌株来源鉴别和真实性鉴定都提供了有效的表型标记和分子标记。

References

- An Li-ying, Yi Xin-xin, Qin Li-na, Shi Si, Tao Yong, Wu Hong, Dong Zhi-yang. 2014. Isolation of *Trichoderma reesei* RutC30 *pyr4* gene mutant by atmospheric room temperature plasma (ARTP) and establishment of a transformation system. *Mycosystema*, 33 (6): 1272 - 1280. (in Chinese)
- 安莉颖, 易欣欣, 秦丽娜, 施思, 陶勇, 伍红, 董志扬. 2014. 里氏木霉 RutC30 常温常压等离子体 (ARTP) 诱变筛选 *pyr4* 基因缺陷型菌株及转化系统的建立. *菌物学报*, 33 (6): 1272 - 1280.
- Bao Da-peng, Feng Ai-ping, Zhang Mei-yan, Tan Qi, Chen Ming-jie, Niu Li-ying, Pan Ying-jie. 2009. Cloning of *le-pyrG*, an orotidine-5'-monophosphate decarboxylase encoding gene from *Lentinula edodes*. *Acta Edulis Fungi*, 16 (2): 13 - 20. (in Chinese)
- 鲍大鹏, 冯爱萍, 张美彦, 谭琦, 陈明杰, 牛丽英, 潘迎捷. 2009. 香菇乳清酸核苷-5'-单磷酸脱羧酶编码基因 *le-pyrG* 的克隆. *食用菌学报*, 16 (2): 13 - 20.
- de Groot M J, Bundock P, Hooykaas P J, Beijersbergen A G. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 16 (9): 839 - 842.
- Granado J D, Kertesz-chaloupkova K, Aebi M, Kues U. 1997. Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*. *Molecular and General Genetics*, 256 (1): 28 - 36.
- Huang Qi-hong, Shen Yu-long, Ni Jin-feng. 2008. Optimization of selective conditions for the selection of uracil auxotrophs of thermophilic archaea *Sulfolobus tokodaii*. *Journal of Shandong University (Natural Science)*, (9): 6 - 10, 17. (in Chinese)
- 黄奇洪, 申玉龙, 倪金凤. 2008. 嗜嗜热古菌 *Sulfolobus tokodaii* 尿嘧啶营养缺陷型筛选条件的最优化及初步筛选. *山东大学学报 (理学版)*, (9): 6 - 10, 17.
- Kondo S, Yamagishia, Oshima T. 1991. Positive selection for uracil auxotrophs of the sulfur-dependent thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* by use of 5-fluoroorotic acid. *Journal of Bacteriology*, 173 (23): 7698 - 7700.
- Miranda D Vande Rhee, Paula M A Graca, Henk J Huizing, Hans Mooibroek. 1996. Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance. *Molecular and General Genetics*, 250 (3): 252 - 258.
- Noel T, Labarere J. 1994. Homologous transformation of the edible basidiomycete *Agrocybe aegerita* with the *URA1* gene: characterization of integrative events and of rearranged free plasmids in transformation. *Current Genetics*, 25 (5): 432 - 437.
- O'Donovan A N G A, Neuhard J. 1970. Pyrimidine metabolism in microorganisms. *Bacteriological Review*, 34 (3): 278 - 343.
- Sun Li, Xu Wei-hong, Cai Hua-qing, Hu Yuan-lei, Lin Zhong-ping. 2001. PEG-mediated transformation of *Lentinus edodes*. *Acta Botanica Sinica*, (10): 1089 - 1092.
- van de Rhee M D, Mendes O, Werten M W T, Huizing H J, Mooibroek H. 1996. Highly efficient homologous integration via tandem *exo-β-1*, 3-glucanase genes in the common mushroom, *Agaricus bisporus*. *Current Genetics*, 30 (2): 166 - 173.
- Wang Lian-hui, Mao Wen-jun, Bao Da-peng. 2014. Selected and molecular verification for uracil auxotrophic mutants of *Lentinus edodes*. *Acta*

- Agriculturae Shanghai, (3): 6 - 9. (in Chinese)
- 王连会, 茅文俊, 鲍大鹏. 2014. 香菇尿嘧啶营养缺陷型菌株的筛选与分子验证. 上海农业学报, (3): 6 - 9.
- Wang Pei-wu, Wang Dong-chang, Li Yu. 2001. Advances of genetic engineering in edible mushroom. Journal of Jilin Agricultural University, (3): 23 - 27. (in Chinese)
- 王丕武, 王东昌, 李 玉. 2001. 食用菌基因工程研究进展. 吉林农业大学学报, (3): 23 - 27.
- Wang Ya-qi, Yang Xiao-li, Bao Li, Gao Hao, Yao Xin-sheng, Liu Hong-wei. 2012. Isolation and identification of secondary metabolites from the solid culture of *Flammulina velutipes*. Mycosystema, (1): 127 - 132. (in Chinese)
- 王雅琪, 杨晓丽, 宝 丽, 高 昊, 姚新生, 刘宏伟. 2012. 金针菇固体发酵菌株次级代谢产物分离鉴定. 菌物学报, (1): 127 - 132.
- Wang Yu-guang, Lei Lu-wang, Sun Jian-bo, Lu Xue-hua, Xia Qi-yu, Zhang Xin. 2010. The selection of uracil auxotroph strain of *Rhodotorula benthica* S8 treated by UV-induced mutation. Genomics and Applied Biology, (5): 838 - 842. (in Chinese)
- 王宇光, 雷禄旺, 孙建波, 卢雪花, 夏启玉, 张 昕. 2010. 紫外诱变筛选海洋红酵母 S8 的尿嘧啶缺陷型菌株. 基因组学与应用生物学, (5): 838 - 842.
- Wu Ming, Zheng Lin-yong, Xu Xiao-yan, Jiang Nan, Wei Wei, Yang Zhi-rong, Luo Xia. 2011. The study on active components of *Flammulina velutipes* and its effect. Edible Fungi of China, (3): 6 - 8. (in Chinese)
- 伍 明, 郑林用, 许晓燕, 江 南, 魏 巍, 杨志荣, 罗 霞. 2011. 金针菇活性物质及其作用研究进展. 中国食用菌, (3): 6 - 8.
- Yan Zuo-mei, Zhang Xu, Li Jie. 2008. Construct of *ura3* gene auxotrophic of *Trichoderma reesei* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Journal of Northeast Agricultural University, (7): 147 - 153. (in Chinese)
- 闫作梅, 张 旭, 李 杰. 2011. 农杆菌介导法构建里氏木霉 *ura3* 基因突变体的研究. 东北农业大学学报, (7): 147 - 153.
- Yang Hua, Li Lian-tai. 2003. Research on edible fungi DNA extractive methods. Edible Fungi of China, (1): 19 - 22. (in Chinese)
- 杨 华, 李联泰. 2003. 食用菌 DNA 提取方法研究. 中国食用菌, (1): 19 - 22.
- Zeng Xu, Liu Fang, Chen Juan, Wang Wei, Xie Bao-gui, Guo Shun-xing. 2015. Genomic sequencing and analysis of genes related to terpenoid compound biosynthesis of *Flammulina velutipes*. Mycosystema, (4): 670 - 682. (in Chinese)
- 曾 旭, 刘 芳, 陈 娟, 王 威, 谢宝贵, 郭顺星. 2015. 金针菇基因组测序及萜类合成关键基因分析. 菌物学报, (4): 670 - 682.
- Zhang Ying-tong, Chen Hai-qin, Song Yuan-da, Zhang Hao, Chen Yong-quan, Chen Wei. 2016. Isolation and characterization of *Mucor circinelloides pyrG* negative mutant strain. China Biotechnology, (3): 38 - 42. (in Chinese)
- 张映瞳, 陈海琴, 宋元达, 张 灏, 陈永泉, 陈 卫. 2016. 卷枝毛霉 *pyrG* 基因缺陷突变株的诱变筛选与鉴定. 中国生物工程杂志, (3): 38 - 42.
- Zhao Xiu-li, Zhang Shan, Song Lu, Wang Meng, Hou Li-hua. 2016. Construction of uracil auxotroph of salt tolerant yeast. Food Science: 1 - 9. (in Chinese)
- 赵秀丽, 张 珊, 宋 璐, 王 檬, 侯丽华. 2016. 耐盐酵母尿嘧啶营养缺陷型菌株的构建. 食品科学: 1 - 9.