

一种根癌农杆菌介导转化平菇菌丝体的新方法

鲍广稳, 祝嫦巍*

(安徽科技学院 生命科学学院, 安徽 凤阳 233100)

摘要: 设计了一种简单高效的根癌农杆菌介导转化平菇菌丝体的方法。利用嵌套平板的方法, 在内层平板培养平菇菌丝, 待菌丝生长至平板边缘, 将经诱导的根癌农杆菌与共培养培养基 (CCM) 混合, 倒入内层平板与外层平板的间隙中, 与正在生长中的菌丝共培养, 实现转化, 利用潮霉素抗性筛选获得转化子, 平均转化效率 33% 左右。此方法操作简单, 周期短, 极易扩大实验规模, 为平菇的分子育种以及其他丝状真菌的遗传转化提供参考。

关键词: 根癌农杆菌介导转化; 菌丝体; 平菇

中图分类号: Q 819 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)11—1168—04

A New Method for *Agrobacterium*-Mediated Transformation of the Mycelia of *Pleurotus ostreatus*

BAO Guangwen, ZHU Changwei

(College of Life Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

Abstract: In this paper, we developed an easy and efficient method for *Agrobacterium*-mediated transformation of the mycelia of *Pleurotus ostreatus*. Using nested plates, the mycelia of *Pleurotus ostreatus* were grown on the inner plate. When the mycelia grew to the edge of the plate, the induced *Agrobacterium tumefaciens* were mixed with co-cultivation medium (CCM) and then were added to the space between the inner and outer plate, the above mixtures further were co-cultivated with the growing mycelia. The average conversion rate of the transformations obtained by the usage of resistance screening to the hygromycin B is about 33%. The advantages of this method are simple operation, short term, and easy to expand the scale of experiments. The results may provide reference for the molecular breeding of *Pleurotus ostreatus* and the genetic transformation of the other filamentous fungi.

Keywords: *Agrobacterium*-mediated transformation, mycelia, *Pleurotus ostreatus*

根癌农杆菌介导转化 (*Agrobacterium*-mediated transformation, ATMT) 是近年来逐渐兴起的一种高效率转化方法。与其它的转化方法相比, 具有转化

率高、遗传稳定、操作简单等优点, 并且其大部分转化子为单拷贝的 T-DNA 随机插入^[1]。利用根癌农杆菌介导转化真菌的转化首先在酿酒酵母中获得成

收稿日期: 2014-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31100070); 安徽省高校省级自然科学基金项目重点项目 (KJ2012A062)。

* 通信作者: 祝嫦巍 (1976—), 女, 吉林四平人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物及相关生物技术方面的研究。

E-mail: zhucw@ahstu.edu.cn

功^[2-3],随后 ATMT 转化技术又扩展到一些丝状真菌。1998 年,De Groot 等人用 ATMT 法转化黑曲霉(*Aspergillus niger*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)等的几种丝状真菌,利用分生孢子和原生质体与农杆菌共培养成功获得转化子。2000 年 Chen 等人在前人的基础上对农杆菌介导转化的方法作了修改。通过子实体菌褶组织与农杆菌共培养,在同源启动子的作用下实现了双孢蘑菇的高效转化^[5]。2006 年 Burns 等人利用不同的农杆菌菌株、不同的启动子表达大肠杆菌潮霉素抗性基因,对不同生长阶段的子实体生长进行转化,找到了转化双孢蘑菇较理想的条件,转化效率高达 80%~90%^[6]。

平菇(*Pleurotus ostreatus*),俗称糙皮侧耳,是一种广泛栽培的食用菌,味美而且营养丰富。同时平菇也是一种可以降解木质素的白腐真菌,可以分泌分泌多种木质纤维素降解酶^[7-9],在自然界的物质循环中发挥着重要作用。另外,白腐真菌对于各种不同结构的天然及合成化学物质如苯、苯胺、氰化物、多环芳烃、偶氮染料等都具有的强大降解能力^[10-11]。因而平菇在食药用品,以及在木质纤维素降解、生物修复等方面都具有很大的开发利用前景。利用各种基因重组技术和遗传操作手段对目的菌株进行改造,以获得所需的性状或细胞特性,是目前生物开发的重要手段。因此有必要建立简单有效的遗传转化方法。目前,以子实体菌褶为受体的农杆菌介导转化效率较高,但子实体存在取材受时间限制较大的问题,栽培周期长,管理费时。作者利用平菇菌丝体为受体,开发了根癌农杆菌介导转化的简单高效方法,为平菇及其他食用菌的分子遗传育种以及其他丝状真菌的遗传转化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

平菇(*Pleurotus ostreatus*)ACCC 52857;根癌农杆菌 EHA105;质粒 pBI121-hyg:由南开大学朱旭东教授惠赠。

1.2 溶液与培养基

各种溶液与培养基参见文献[12]。

1.2.1 贮存液 M-N 溶液:30 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,15 g NaCl,溶于 1 L 水中;微量元素溶液: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 各

100 mg 溶于 1 L 水中;K4 缓冲液:218 g K_2HPO_4 溶于 1 L 水中,用磷酸调节 pH 至 4.9;1% CaCl_2 溶液:1 g CaCl_2 溶于 100 mL 水中;50%甘油:50 mL 甘油与 50 mL 水互溶;20%葡萄糖溶液:20 g 葡萄糖溶于水中,定容至 100 mL;100 mg/mL 卡那霉素(Kanamycin):1 g 卡那霉素溶于 10 mL 水中,过滤除菌;100 mmol/L 乙酰丁香酮(Acetosyringone(AS)):0.019 7 g 乙酰丁香酮溶于 1 mL 70%乙醇中,过滤除菌,现用现配。

1.2.2 培养基 LB 培养基:10 g 蛋白胨,5 g 酵母抽提物,10 g NaCl,pH 7.5,定容至 1 L;PDA:200 g 去皮土豆,20 g 葡萄糖,3 g KH_2PO_4 ,1.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,15 g 琼脂,定容至 1 L;诱导培养基(IM):0.8 mmol/L K4 缓冲液,20 mL M-N 溶液,1 mL 1% CaCl_2 溶液,5 mL 微量元素溶液,2.5 mL 20% NH_4NO_3 溶液,5 mL 甘油,40 mL 1 mol/L MES(2-N-玛琳代乙烷磺酸)缓冲液,10 mL 20%葡萄糖溶液,2 mL 卡那霉素溶液,2 mL 乙酰丁香酮溶液,定容至 1 L;共培养培养基(CCM):5 mL 20%葡萄糖溶液,10 g 琼脂,其他成分与 IM 培养基相同;选择培养基(SM):PDA 培养基,含有 250 mg/L 潮霉素(Hygromycin B)。

1.3 方法

1.3.1 平菇菌丝体的培养 在 120 mm 培养皿中放入一个 60 mm 培养皿底,灭菌。将固体 PDA 培养基小心倒入内层培养皿中,注意将内层培养皿倒满,但不要溢出。将 4 ℃保存的平菇菌丝体在 PDA 平板中活化,取 0.5 cm×0.5 cm 大小的菌种块置于内层平板中央,25 ℃培养至菌丝生长到内层培养皿边缘。

1.3.2 根癌农杆菌的培养 从-70 ℃保存的根癌农杆菌储液取少量的菌液,于 LB 固体培养基(含有 Rif 25 mg/L,Kan 100 mg/L)上划线培养,28 ℃培养;待平菇菌丝体长满内层平板后,取活化的根癌农杆菌转接到 5 mL LB 培养基中(Rif 25 mg/L,Kan 100 mg/L)中,28 ℃、200 r/min 振荡培养过夜;以 1%的接种体积分数转接于 100 mL LB 培养基(Kan 100 mg/L)中培养至 A_{600} 为 0.6~0.8;3 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,将细胞重悬于 100 mL IM 培养基中,室温条件下 100 r/min 诱导培养 3 h。

1.3.3 平菇菌丝体与根癌农杆菌共培养 根癌农杆菌诱导培养 3 h 后,3 000 r/min 离心 10 min,收集

菌体,将细胞重悬于冷凉至 50 ℃左右的 100 mL CCM 培养基中,混匀。将混有根癌农杆菌的 CCM 培养基迅速倒入内层平板与外层平板间隙,高度与内层平板基本一致。25 ℃下培养 3 d,避光。

1.3.4 筛选转化子 共培养 3 d 后,平菇菌丝已生长至外层平板的边缘,取在 CCM 培养基中生长的菌丝,切成 1 cm² 左右的小块,置于选择培养基中,25 ℃培养 7~14 d。取在初筛平板中的新生菌丝,转移至新鲜的选择培养基中进行复筛。

1.3.5 转化子的 PCR 验证 使用天根植物基因组提取试剂盒提取基因组 DNA。使用引物 hph-u: acagcgtctccgacctgat 和 hph-d: gcccaagctgcatcatcga 进行 PCR 扩增。

2 结果与分析

2.1 潮霉素对平菇 (ACCC 52857) 菌丝生长的抑制

将平菇菌丝接种于含有不同浓度潮霉素的 PDA 平板中,25 ℃培养 7 d,测量菌落直径,生长情况见表 1。

表 1 平菇 (ACCC 52857) 对潮霉素的抗性

Table 1 Assay on hygromycin B resistance of *Pleurotus ostreatus* (ACCC 52857)

潮霉素质量浓度/(mg/L)	菌落直径/mm
0	78±1.2
50	65±1.1
100	42±0.6
150	28±0.2
200	12±0.2
250	0
300	0

在 PDA 平板中,250 mg/L 的潮霉素可以完全抑制平菇菌丝的生长,因此选择含有 250 mg/L 的潮霉素 B 的 PDA 培养基为选择培养基。

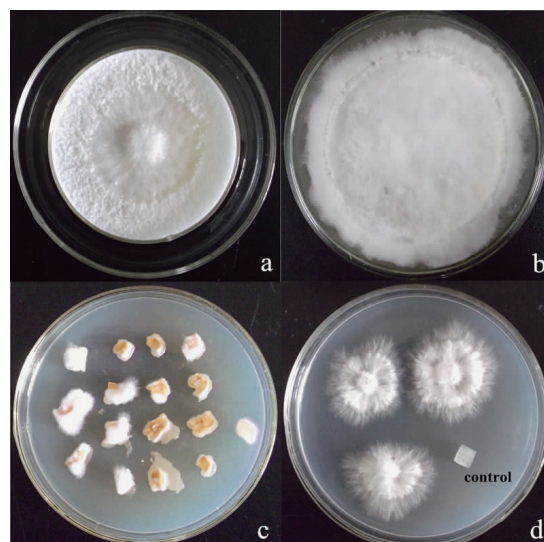
2.2 根癌农杆菌介导转化平菇菌丝体

按上述试验方法进行农杆菌阶段平菇菌丝体的转化,我们已经成功的获得转化子,见图 1。多次试验的平均转化效率为 33% 左右。

2.3 转化子的 PCR 验证和遗传稳定性

转化子经复筛纯化后,提取基因组 DNA,使用引物 hph-u 和 hph-d 进行 PCR 扩增,扩增条带与预期相符,约 800 bp,说明潮霉素抗性基因已整合在

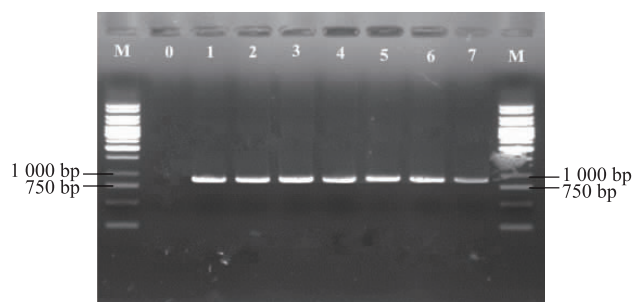
转化子的基因组 DNA 中,见图 2。



a. 制作套嵌平板,在内层平板中培养平菇菌丝体,至生长到平板边缘;b. 将经诱导的根癌农杆菌与共培养培养基 (CCM) 混合,倒入内层平板与外层平板的间隙中,共培养;c. 在含有潮霉素的平板中进行初筛;d. 复筛

图 1 以平菇菌丝体为受体的根癌农杆菌介导转化

Fig. 1 *Agrobacterium*-mediated transformation of the mycelia of *Pleurotus ostreatus*



M: Marker; 0: 阴性对照; 1~6: 转化子扩增; 7: 质粒 pBI121-hyg 扩增

图 2 转化子的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of *P. ostreatus* transformants

随机挑选 10 个转化子,在不含有潮霉素的 PDA 平板中进行传代培养,验证转化子的遗传稳定性。分别传代 8 次,然后转接与含有潮霉素的 PDA 选择培养基中,所有转化子均生长正常,证明其遗传稳定。

3 结语

我们巧妙地利用了套嵌平板的方法,使根癌农杆菌与生长中的菌丝体共培养,实现转化。操作过

程中注意,内层平板中的PDA培养基与外层的CCM培养基均要倒至与内层平板高度基本一致,有利于平菇菌丝体的蔓延生长。

与利用子实体菌褶为受体相比,以菌丝体为受体的农杆菌介导转化效率较低。但子实体取材受时间限制较大。栽培周期长,管理费时。且子实体菌褶部分常常会出现表面消毒不彻底,杂菌污染的现象。而菌丝体生长周期短,不易污染,培养条件简单,在实验室条件下很容易放大试验规模,虽然转化效率低于以子实体为受体的转化效率,也同样可

以获得较多数量的转化子。

蔡志欣等人^[13]探讨了农杆菌介导的双孢蘑菇菌丝转化技术。该方法利用液体静止培养20 d的菌丝体为受体进行转化,转化效率为8%~10%。虽然目前以菌丝体为受体的农杆菌介导转化的研究还较少,但从我们的实验结果看,以菌丝体为受体是一种值得关注的方法。生长中的菌丝体的细胞壁和细胞膜成分代谢比较活跃,因而可能也比较容易实现侵染^[14],这可能也是我们的转化效率略高于其他报道的原因之一。

参考文献:

- [1] Michiels C B, Hooykaas P J, van den Hondel C A, et al. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. **Current Genetic**, 2005, 48(1): 1-17.
- [2] Bundock P, den Dulk-Ras A, Beijersbergen A, et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **EMBO Journal**, 1995, 14(13): 3206-3214.
- [3] Bundock P, Hooykaas P J. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 1996, 93(26): 15272-15275.
- [4] de Groot M J, Bundock P, Hooykaas P J, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi[J]. **Nature Biotechnology**, 1998, 16(9): 839-842.
- [5] 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(10): 4510-4513.
- [6] Burns C, Leach K M, Elliott T J, et al. Evaluation of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus* using a range of promoters linked to hygromycin resistance[J]. **Molecular Biotechnology**, 2006, 32(2): 129-138.
- [7] Tinoco R, Acevedo A, Galindo E, et al. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2011, 38(4): 531-540.
- [8] da Luz J M, Nunes M D, Paes S A, et al. Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes[J]. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2012, 43(4): 1508-1515.
- [9] Salame T M, Knop D, Levinson D, et al. Redundancy among manganese peroxidases in *Pleurotus ostreatus* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2013, 79(7): 2405-2415.
- [10] Gassara F, Brar S K, Verma M, et al. Bisphenol A degradation in water by ligninolytic enzymes [J]. **Chemosphere**, 2013, 92(10): 1356-1360.
- [11] Casas N, Blázquez P, Vicent T, et al. Laccase production by *Trametes versicolor* under limited-growth conditions using dyes as inducers[J]. **Environmental Science and Technology**, 2013, 34(1-4): 113-119.
- [12] Romaine C P, Schlagnhauser C. Mushroom(*Agaricus bisporus*)[J]. **Methods in Molecular Biology**, 2006, 344(2): 453-463.
- [13] 蔡志欣, 陈美元, 廖剑华, 等. 农杆菌介导的双孢蘑菇菌丝转化技术探讨[J]. **食用菌学报**, 2013, 20(1): 9-12.
CAI Zhixin, CHEN Meiyuan, LIAO Jianhua, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus* using mycelia grown in submerged culture[J]. **Acta Edulis Fungi**, 2013, 20(1): 9-12. (in Chinese)
- [14] Tzfira T, Citovsky V. The *Agrobacterium*-plant cell interaction. Taking biology lessons from a bug [J]. **Plant Physiology**, 2003, 133(3): 943-947.