青岛农业大学
毕 业 论 文（设计）

题　　目：平菇 DNA 转化技术研究现状

姓　　名：彭媛媛

学　　院：生命科学学院

专　　业：生物技术（食用菌）

班　　级：2016 级 01 班

学　　号：20165172

指导教师：于浩

2020 年 6 月1 日

青岛农业大学
毕业论文（设计）诚 信 声 明

本人郑重声明：所呈交的本科毕业论文（设计）是本人在指导老师的指导下，进行研究工作所取得的成果，成果不存在知识产权争议。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体在文中均作了明确的说明并表示了谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

毕业论文（设计）作者签名：

年　　月　　日

目　录

摘要 I
Abstract II
前　言 1
一、平菇 DNA 转化技术的概述 2
（一）平菇的简介 2
（二）平菇 DNA 转化技术 2
二、食用菌遗传转化的研究历史 2
（一）真菌遗传转化的研究历史 2
（二）食用菌遗传转化的研究历史 2
三、平菇 DNA 转化中常用的载体与分子标记 3
（一）平菇 DNA 转化常用的筛选标记 3
（二）常见的平菇 DNA 转化载体 3
（三）平菇启动子 4
四、平菇 DNA 转化技术的常用方法 4
（一）PEG 介导 4
（二）电激法 4
（三）基因枪法 5
（四）限制酶介导的 DNA 整合法 5
（五）农杆菌介导转化法 5
结　论 5
参考文献 7
致　谢 9

平菇 DNA 转化技术研究现状

生物技术（食用菌）专业 2016 级 1 班　　彭媛媛

指导教师：于浩

摘要：平菇，学名糙皮侧耳，是我国产量最大的食用菌品种之一。随着生物学研究进入基因组学时代，利用分子生物学技术对特定基因进行定向改造的分子遗传育种成为平菇育种的发展趋势，而 DNA 转化技术是分子育种的基础。DNA 转化技术在原核生物、酵母菌、动植物中应用较成熟，但在平菇中存在效率低、操作复杂等问题，限制了平菇的分子育种工作。本文对平菇 DNA 转化技术的研究现状进行了综述。从平菇的 DNA 转化技术的研究历史，DNA 转化用载体与标记技术、DNA 转化技术手段等方面进行了详细阐述。

关键词：平菇；食用菌；DNA 转化技术

Current progress of DNA transformation technology in *Pleurotus ostreatus*

Student majoring in Biotechnology (edible fungi) Peng Yuanyuan

Tutor: Yu Hao

Abstract: *Pleurotus ostreatus*, also known as Pinggu, is one of the largest yield variety of edible mushroom species in China. With the development of biological genomic research, genetic breeding based on the modification of genes through molecular technology is the future trend for producing new *P. ostreatus* variety. DNA transformation is the basic technology of genetic breeding. DNA transformation technology is a mature technique in genetic modification of bacteria, plant and animals. However, DNA transformation in *P. ostreatus* is low efficiency and requires lots of hard work which inhibits the application of genetic breeding in P. ostreatus. In this review, the research progress of DNA transformation technology in P. ostreatus was discussed in detail including history of DNA transformation in *P. ostreatus*, vector and reporter genes used in DNA transformation and methods used for DNA transformation in P. ostreatus

Key words: *Pleurotus ostreatus*; Edible mushroom; DNA transformation technology

前　言

我国是食用菌生产和消费大国，我国的食用菌产量占全世界总产量的 70%以上。侧耳类食用菌是我国最重要的栽培品种，包括平菇、杏鲍菇、秀珍菇等，其中，平菇是侧耳属最具代表性的菌株，是我国重要的商业食用菌。食用菌的产量与菌种品质、栽培条件等息息相关，遗传育种可以创造新的食用菌品种，提高食用菌菌种品质，引入优良性状，对于食用菌产业发展具有重要意义。

食用菌遗传育种包括诱变育种、杂交育种、融合育种和分子育种等。[1]分子育种是将基因工程技术应用于育种工作的一种手段，通过导入特定基因，增加食用菌的优良特性，具有育种周期短、目的性强，效率高的优点。分子育种也是平菇育种未来的发展趋势。平菇的遗传育种对于侧耳属和其他食用菌的遗传育种具有重要意义。

高效的遗传操作体系是食用菌遗传育种的基础。相对于细菌、酵母菌和动植物而言，食用菌的遗传操作体系研究起步较晚，因此缺乏较为成熟的遗传操作体系。[2]遗传操作系统包括 DNA 的转化过程和 DNA 进入宿主细胞后过程两部分，由于食用菌中同源重组效率较低，因此 DNA 在转化到食用菌细胞内后常常以核外基因的形式存在，不能稳定遗传。因此提高 DNA 的转化效率是提高遗传操作成功率的有效途径。

本文综述了平菇 DNA 转化技术研究现状,从食用菌及平菇遗传转化的技术研究发展历史、平菇遗传转化的技术研究发展现状等方面进行论述,并就其应用发展前景问题进行合理的分析和展望。

一、平菇 DNA 转化技术的概述

（一）平菇的简介

平菇*(Pleurotus ostreatus*)，学名糙皮侧耳，侧耳属食用菌。我国栽培的侧耳属食用菌约有 10 种[3],主要包含糙皮侧耳、佛罗里达侧耳、白黄侧耳、肺形侧耳等，其中糙皮侧耳的栽培最为广泛。历史上我国对平菇的大面积栽培始于上世纪 70 年代[4],目前已发展成为我国食用菌市场上占比重最大的一种,且具有广大的前景。

（二）平菇 DNA 转化技术

与其他真核生物相比，食用菌的遗传转化研究起步较晚，其中平菇是目前食用菌中遗传操作体统研究最完善的品种之一[5]。目前，平菇的 DNA 转化的主要方法有：基因枪法，PEG 介导、REMI 法、电激法和农杆菌转化法。[6]

二、食用菌遗传转化的研究历史

（一）真菌遗传转化的研究历史

真核生物在人类的生产生活、医疗保健、食品工业、农业、精细化工等领域都扮演了重要角色。真菌中的遗传转化报道首先出现在 1973 年，Mishra NC 利用不能合成肌醇的粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)菌株作为研究材料，将野生型(inos+)的基因转化到营养缺陷型菌株中，并且在不含有肌醇的选择培养基上进行筛选，最终获得了能够合成肌醇的菌株[7]。后来 Case E M 等人在 1979 年在粗糙脉孢菌中进一步完善了 DNA 转化体系。[8]随后，越来越多的真菌遗传操作系统被建立并报道，目前所有属的真菌都具备了遗传操作系统。[9]~[16]

（二）食用菌遗传转化的研究历史

与酵母菌和丝状真菌相比，担子菌的遗传操作体系更加困难。Munoz-RivasA 等人在 1986 年首次通过 PEG 介导的转化方法把 trpC 基因转录到裂褶菌色氨酸营养缺陷型菌株中，从而获得了能够合成色氨酸的野生型裂褶菌菌株。这是首次在担子菌中报道了 DNA 转化系统。[17]

1991 年 Challen MP 等通过 PEG 介导的 DNA 转化方法将外源 DNA 转化到双孢菇中，并成功获得了转化子[18]，同年 Roycr JC 等人采用电击转化的方法把二氢乳清酸脱氢酶基因（URAl）转化到了杨树菇营养缺陷型菌株中，并且获得了野生型转化子，这是首次在商品化的食用菌品种中实现了外源 DNA 的转化。[19]

随后越来越多的食用菌外源 DNA 转化手段被开发出来，包括 PEG 介导的转化、电击转化、基因枪法、农杆菌介导的转化等。目前，几乎所有的食用菌中都建立了稳定遗

传的转化体系，其中平菇中的 DNA 转化系统是研究的最清楚的。

三、平菇 DNA 转化中常用的载体与分子标记

利用载体携带目标基因进行遗传转化是最常用的 DNA 转化方法。

（一）平菇 DNA 转化常用的筛选标记

平菇 DNA 转化的筛选标记主要有营养缺陷型筛选和抗生素抗性基因两种。由于食用菌的营养缺陷型不容易获得，营养缺陷型实验复杂不容易操作，而且容易产生回复突变，因此目前包括平菇在内的食用菌的遗传转化操作中很少采用这一种筛选方法。使用抗性基因进行转化子以及外源基因的标记是最常用的方法。其中潮霉素抗性基因是最常见的一种显性标记基因。近年来萎锈灵抗性基因在平菇的遗传转化中的应用也越来越多。

潮霉素是食用菌转化中最常用的显性筛选标记，野生型的平菇菌丝不能在高浓度的潮霉素中生长，然而导入了潮霉素抗性基因后菌丝就获得了在高浓度潮霉素中生长的能力，根据这一特性可以进行转化子的筛选。[20]

萎锈灵是一种常用的真菌杀菌剂。萎锈灵能够作用于琥珀酸脱氢酶上面的一个亚基，从而抑制真菌的产能系统，从而杀死真菌。当琥珀酸脱氢酶发生突变之后活力降低，同时对萎锈灵的敏感型降低，菌丝就获得了抗萎锈灵的能力。因此可以利用突变后的琥珀酸脱氢酶基因作为萎锈灵抗性基因导入到野生型菌株中，使得转化子获得了在高浓度萎锈灵中生长的能力[21]。

除此之外，颜色标记，GFP、RFP、荧光素酶、GUS 也是在平菇 DNA 转化中常用的一种报告基因。虽然说荧光标记不能够作为显性标记进行转化子的筛选，但是荧光标记可以对导入的基因是否正确转录翻译进行报告，并且可以快速简便的鉴定转化子，因此常常被用于平菇的 DNA 转化中。

（二）常见的平菇 DNA 转化载体

常见的平菇 DNA 转化载体有 pAN7-1、pLG-hph、pTMl、pCAMBIA1301。

pAN7-1 中含有潮霉素显性标记基因，Ming 等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。但是后续追踪发现，转化后的外源基因在平菇中并未整合到染色体上，因此 3-6 周之后外源 DNA 消失。

pLG-hph 系列质粒也是包含了潮霉素显性标记基因，实验表明使用该质粒目的基因可以有效的整合到平菇的基因组中。

pCAMBIA1301 是常见的植物转化载体，也可以用于平菇的 DNA 转化中，以该载体为代表的一系列载体都是农杆菌转化载体，含有潮霉素抗性基因和 GFP 报告基因，

在农杆菌的介导下将外源基因整合到平菇的染色体中去，并且能够稳定的遗传。

pTMl 系列载体是以萎锈灵抗性基因作为筛选基因的，该抗性基因来自于平菇自身，其中一个氨基酸发生了突变，该载体可以将目标基因高效整合到平菇的染色体上面并且稳定遗传。

（三）平菇启动子

目前在食用菌中通常采用的启动子有 ras 基因启动子，甘油-3-磷酸脱氢酶(GPD)基因启动子和 sdi 启动子。最常用的就是香菇中以上基因的启动子，除了香菇的启动子之外，食用菌遗传转化中通常使用同源启动子或者宿主菌株自身的以上基因的启动子进行基因的转录，有报道称使用同源启动子或者宿主细胞的自身的启动子能够增加宿主细胞自身 RNA 聚合酶识别的效率，从而获得更高的表达效率。

四、平菇 DNA 转化技术的常用方法

（一）PEG 介导

PEG 能有效地使细胞膜与细胞膜之间,及外源 DNA 与细胞膜之间形成大分子桥,促使受体与细胞间的接触和粘连或是通过直接引起细胞表面的电荷紊乱,干扰细胞间的识别而有利于细胞间的融合。2006 年采用了 PEG 介导的高效平菇细胞转化系统,得到了 80-180 个整合了潮霉素 B 稳定抗性的细胞。比以前研究报道的转化效率高 400-800 倍。[22]

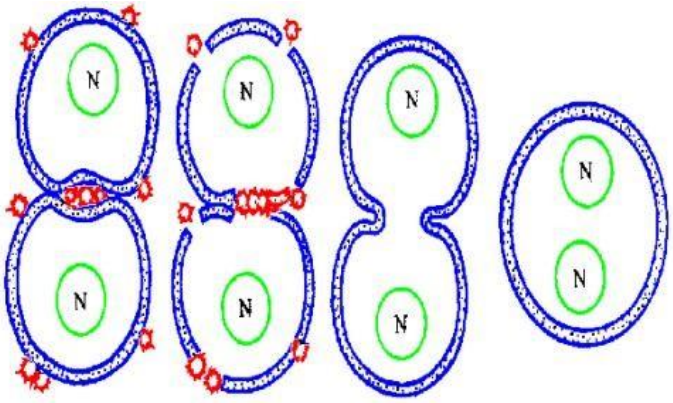

图 1 PEG 介导细胞融合过程

（二）电激法

电激转化的原理主要是通过利用直流短时间的电脉冲对细胞做出一种可恢复性的电击穿,使原生质膜被击穿,大分子桥也得以有效地穿过质膜和核膜,外源 DNA 与细胞受体外源 DNA 之间发生了重组。一般的研究认为,当细胞中电场的强度和时间常数以一定的方式发生组合而导致 60%-70%的细胞死亡率时,转化子的效率可以达到最高的水平。

受体细胞电转化的效率一般是用生物化学的方法直接介导基因转化的 10-20 倍。虽然电激法和传统的 PEG 介导法的基因转化率一般相差不大,但是这种电激法比传统 PEG 法的操作更为简单方便，且所需的 DNA 量少,适应的范围广。[23]

（三）基因枪法

该法主要是利用高速金属微粒把外源的基因导入受体细胞生物的完整细胞或受体组织中。该法在使用时,首先要做的是直接把外源质粒细胞的 DNA 与直接进入金属细胞的微粒进行混合,使质粒细胞的 DNA 直接包裹在金属微粒的细胞表面,制成金属微弹,然后再直接利用一定的压力和装置将金属微弹高速地射击,使金属微弹直接进入受体细胞内进行基因转化。金属微弹射击后的细胞或受体组织经过一段时间的恢复培养后,将其转移至选择培养基上筛选。在这一过程中,质粒 DNA 浓度、枪击的压力及直接进入受体细胞的状态等这些因素对受体细胞转化的效果都应该具有重要影响。据国外媒体报道,基因枪法转化并不能有效地提高受体细胞转化的效率,但对于在实验室的条件下不能良好培养或不能成功获得细胞中足够的再生原生质体的真菌有重要作用。[24]

图 2 基因枪法导入外源基因

（四）限制酶介导的 DNA 整合法

REMI(RestrictionEllzyme Mediated DNA Integrati,REMI)法是上世纪 90 年代发展起来的一种能较大幅度提高转化率的方法。该法的主要原理是通过限制酶切断受体细胞的 DNA,产生的末端会在酶切体系下与经过限制性的内切酶活体切断的线性化的线性化的质粒 DNA 连接。该整合法可作为标签对细胞中功能各异的基因进行分离。[25]

（五）农杆菌介导转化法

农杆菌介导法转基因比较稳定、拷贝数低、转化率高。对于平菇等食用菌，该法可以以子实体为转化材料，避免了原生质体为转化材料再生率低的缺点 [26]，目前已在真菌转化的研究中快速发展。

结　论

食用菌产业在我国农业产业中占据重要地位，2018 年总产量接近 4000 万吨，总产

值接近 3000 亿元，然而相对于动植物，食用菌的分子育种研究和应用起步较晚，与产业发展相比较严重滞后。遗传操作系统的建立是进行分子育种的基础，与其他的生物相比较，食用菌的遗传操作系统并不完善，由于转化效率低和同源重组效率低的原因，导致了食用菌的分子生物学研究进展缓慢。平菇是食用菌中最具代表性的菌株，平菇中 DNA 转化系统的研究对于食用菌的遗传转化系统的建立具有重要意义。

根据最近平菇 DNA 的转化研究可以发现，以农杆菌介导的遗传转化和电击转化是最常用的转化方法，萎锈灵和潮霉素抗性基因是最常见的转化子筛选基因。经过研究者不断的努力，已经能够将外源 DNA 高效的转化到平菇的菌丝体中。

虽然已经能够将外源基因转化到平菇菌丝内部，但是由于食用菌中同源重组效率偏低，基因的定向插入和定向敲除仍然存在障碍，目前难以获得无痕的插入或者敲除的菌株。另一方面由于可使用的先天性标记基因太少，因此不可能连续的向平菇菌丝体中多次导入基因。但是随着新的遗传操作系统的发现，例如 Crispr 系统，这些新的遗传操作系统在平菇中的应用将会大大的加快平菇的遗传操作体系的建立，将为适应越来越多的生物技术应用的需求和平菇分子育种工作提供有效的分子生物学工具。

目前,通过基因分析和工程等技术手段将外源基因导入食用菌以进一步提高其部分生物学特性,如使食用菌抗虫、抗病提高其利用栽培基质的能力,木质素、纤维素降解的能力,是未来的包括平菇在内的食用菌遗传转化育种生物学研究的主要目标和方向而构建一个高效的遗传表达系统是实现食用菌表达外源基因的先决条件。

参考文献

[1]高坤梅,邢志伟,郑素月,等.白灵菇杂交子的筛选及鉴定[J].北方园艺,2015,39(09):121-123.

[2]方明；姚方杰；陈影；王晓娥。几种主要食用菌的遗传转化研究进展菌物研究 2012。9

[3]王泽生．国内外食用菌产业现状与发展趋势[J]．中国菌物产业与科技研讨会暨展览会论文集，2005．

[4] 王贺祥．食用菌学[Z]．北京：中国农业大学出版社，2004．

[5] 董晓雅. 平菇遗传转化体系和转漆酶工程菌株的构建[D]. 河南农业大学, 2010.

[6] 刘洪博. 平菇遗传转化的研究进展[J]. 安徽农业科学(08):3152-3154.

[7]Mishra N C，Szabo G，Tatum E L．Nucleic acid induced genetic changes in Neurospora．In Niu M C and Segal S J(ed)The role of RNA in reproduction and development[M]．Amsterdam：Elsevier／North HollandPublishing Co，1973．259--268．

[8]Case E M，Schweizer M，Kushner R S．Efficient transformation ofNeurospora crassa by utilizing hybrid Plasmid DNA[J]．Pcoceedings of theNational Academy of Sciecnes of the United States of America, 1979，76(10)：5259～5263．

[9]Jia J H，Buswell J A，Peberdy J F．Transformation of the edible fungi，Pleurotus ostreatus andVolvariella volvacea[J]．Mycological Research，1 998，102(7)：876～880．

[10]Wang J，Guo L Q，Zhang K et a1．Highly efficient Agrobacterium-mediated transformation of Volvariellavolvacea[J]．Bioresource Technology，2008，99(17)：8524～8527．

[11]Zhao F Y，Lin J F，Zeng X L，et a1．Improvement in fruiting body yield by introduction of the Ampullaria crossean multi—functional cellulase gene into Volvariella volvacea[J]．Bioresource Technology,2010，101(16)：6482～6486．

[12]Chen X，Stone M，Schlagnhaufer C，et a1．A fruiting body tissue method for efficient Agrobacterium-mediated transformation of Agaricus bisporus[J]．Applied and Environmental Microbiology．2000；66(10)：45lm4513．

[13]Burns C，Gregory KE，Kirby M，et a1．Efficient GFP expression in the mushrooms Agaricus 6 卸 OtTdS and Coprinus cinereus requires introns[J]．Fungal Genetics and Biology．2005；42(3)：1991-199．

[14]Himno T，Sato T，Yaegashi K．Efficient transformation of the edible basidiomyceteLentinus edodes with a vector using a glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase promoter to hygromycin B resistance[J]．Molecular and General Genetics，2000，263(6)：1047～1052．

[15]Kuo C Y，Huang C T．A reliable transformation method and heterologous expression of 13-glucuronidase in Lena'nula edodes[J]．Journal of Microbiological Methods，2008，72(2)：111-115．

[16]Sun L，Cai H Q，Xu W H，et a1．Efficient transformation of the medicinal mushroom Ganoderma lucidum[J]．Plant Molecular Biology Reporter，2001，19：383a-383j．

[17] Mufioz-Rivas A，Specht C A，Drummond B J，甜 a1．Transformation of the basidiomycete Schizophyllum commune[J]．Molecularand General Genetics，1986，205(1)：103-106．

[18] Challen M P，gao B G，Elliott TJ．Transformation strategies forAgaricus[J]．1 991．

[19]Royer J C，Horgen P A．Towards a Uansformafion of the edible basidiomyceteAgrocybeaegerita with the URAl genea：characterization of integrative events andofrearranged freeplasmids in transformants[J]．Current Genetics，199 1，22(1)：53-59．

[20] Peng M et a1．Recovery of recombinant plasmids from Pleurotus ostreatus transformants[J]．Current Genetics，1992，22(5)：53-59．

[22] XIM B G，MAGAE Y，YOU Y B，et aL IB olationandtion and transformation of uracil auxotrophs of the edible basidiouaycete P／eurotus ostre 以 us[J]．FEMS Microbiol Lett，1999，18l(2)：225-228．

[22] Li G，Li R Liu Q，et a1．Ahighly efficient polyethylene glycol-mediated transformation method for mushrooms[J]．FEMS microbiology letters，2006，256(2)：203—208．

[23]Peng M，Lelnke P A，Shaw JJ．Improved conditions for protoplast formation and transformation ofPleurotus ostreatus[J]．Applied Microbiology and Biotechnology，1993，40(1)：101．106．

[24]Sunagawa M，Magae Y．Transformation ofthe edible mushroom Pleurotus ostrea!tus byparticle bombardment[J]．FEMS microbiology letters，2002，2 1 1(2)：143．146．

[25] Me T，Honda Y，Hirano T，eta1．Stable transformation ofPleurotus ostreatus to hygromycinB resistance using Lentinus eAodes GPD expression signals[J]．Appliedmicrobiology andbiotechnology，2001，56(5)：707-709．

[26]一种根癌农杆菌介导转化平菇菌丝体的新方法 A New Method for Agrobacterium-Mediated Transformation of the Mycelia of Pleurotus ostreatus [期刊论文] 鲍广稳,祝嫦巍,BAO Guangwen,ZHU Changwei-《食品与生物
技术学报》2015 年 11 期

[27]李东屏．原生质体技术【M】．长沙：湖南科技出版社。2005：132．

致　谢

在本文的撰写过程中，在此忙碌又充实的毕业实习过程中，自然少不了实验室全体成员的悉心指导和热心帮助。在此实习过程中，给予我莫大帮助的便是我的导师于浩老师，在这里跟老师说一声感谢，是他的悉心指导才使得我的各项科研工作能够顺利的进行，也感谢他对于我的每一个问题都不厌其烦的做出详细的解答，他是我的导师，更是我学术研究道路上的引路人；其次，还要感谢我的师姐孙倩姝，感谢她愿意为我扩充知识，为我答疑解惑；感谢我的班主任田雪梅老师，经常开导我鼓励我。感谢父母的养育之恩，尽最大的努力为我营造了最好的学习、生活条件，并在我迷茫的时候陪伴我、照顾我，我唯有努力学习，用成绩来回报。最后，感谢学校、学院所提供的实验平台，让我有机会、有条件去了解神奇的微生物世界。感谢多年来传授我知识的老师们，更要感谢那些对我学习上支持和鼓励的人。同时感谢所有关心帮助过我的同学、老师和学校。

天下没有不散的宴席，虽然大四的生活多半时间还是呆在学校里，但是论文致谢语写就的那一刻也真正标志着我与这所学校就此别离了，没有伤感，更多的是遗憾，但是总归不如意事十有八九，过去的不能挽回，人应该大胆向前看，所以这段文字应该像它的标题一样充满感恩和致谢，感谢四年来在我的成长道路上扶持过我，指点过我的人。