

# 原生质体法制备根系腐生型共生菌（伞菌目）单核化菌丝

## Protoplast regeneration to obtain monokaryotic strain from the *Quercus*-associated *Clitopilus hobsonii*

王玉宸<sup>1,2</sup>, 王欣玉<sup>2,§</sup>, 彭龙<sup>1,2</sup>, 袁志林<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> 林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院, 北京; <sup>2</sup>, 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 杭州; <sup>§</sup>现工作单位: 台州学院, 医学院, 台州

\*通讯作者邮箱: [yuanzl@caf.ac.cn](mailto:yuanzl@caf.ac.cn)

**摘要:** 菌体单核化的方法主要包括机械分割法、化学处理法、孢子分离法和原生质体再生法等。机械分割法对细胞破坏程度大, 分割后细胞存活率降低, 而且分割产物不均匀, 单核体得率低; 化学处理法对于处理条件要求严格, 具有细胞毒性; 孢子分离法仅适用于产孢菌株单核体的制备, 且单核孢子的形成需要经过遗传重组、减数分裂, 因而遗传信息不能完整保留; 原生质体再生法制备的单核体未经过减数分裂及遗传重组, 亲本细胞核内的遗传信息能更为完整、准确地保留, 而且经过再生后能够获得两种核型的单核体。本文介绍了异核双核体担子真菌原生质体再生单核化技术, 以及单核体菌株的鉴定方法, 为开展真菌基因组测序和高质量组装提供技术依据。

**关键词:** 担子菌, 单核体, 原生质体

**研究背景:** 荷伯生氏斜盖伞 *Clitopilus hobsonii* (Agaricales) 首次分离自栎类林腐木 (Orton, 1960), 是典型的土壤腐生真菌。笔者发现该菌在大果栎 *Quercus macrocarpa*、舒玛栎 *Quercus shumardii*、牛栎 *Quercus michauxii*、琴叶栎 *Quercus lyrata*、白栎 *Quercus fabri* 等新鲜菌根组织中均能分离到。进一步研究发现, 该菌能够促进栎类幼苗生长, 且与多种苗木建立共生关系, 形成类似“微菌核”的侵染结构, 促进苗木根系发育和养分吸收。笔者认为破译该菌的遗传信息可能为丰富外生菌根真菌起源于腐生真菌这一学说提供更多的基因组进化证据。然而该菌株为异核双核体, 基因组存在不同程度的杂合率, 这将给基因组组装和注释带来一定挑战, 影响后续进化生物学分析和功能研究。单核化作为“简化”复杂基因组的一种策略, 是有效开展异核双核真菌全基因组测序分析的重要环节。因此, 制备荷伯生氏斜盖伞单核体菌株将为顺利开展基因组测序和组装奠定基础。

31

## 32 材料与试剂

- 33 1. 荷伯生氏斜盖伞双核体菌株
- 34 2. DAPI (sigma, catalog number: D9542)
- 35 3. 细胞壁裂解酶 (sigma, catalog number: L1412)
- 36 4. 真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒 (Aidlab, catalog number: DN4102)
- 37 5. I-5™ 2x High-Fidelity Master Mix (TSINGKE, catalog number: TP001)
- 38 6. 琼脂糖 (Genview, catalog number: 9012-36-6)
- 39 7. 超纯水
- 40 8. ddH<sub>2</sub>O
- 41 9. PDA 培养基 (见溶液配方)
- 42 10. YMG 液体培养基 (见溶液配方)
- 43 11. MYG 再生培养基 (见溶液配方)
- 44 12. 0.5 M 蔗糖溶液 (见溶液配方)
- 45 13. 0.1 M PBS 缓冲液 (见溶液配方)
- 46 14. 葡萄糖 (Macklin, catalog number: D810588)
- 47 15. 酵母提取物 (Oxoid, catalog number: LP0021)
- 48 16. 琼脂 (BD, catalog number: 214010)
- 49 17. 麦芽提取物 (Cool Chemistry, catalog number: BL360016)
- 50 18. 蔗糖 (沪试, catalog number: 10021418)
- 51 19. NaCl (沪试, catalog number: 10019318)
- 52 20. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (沪试, catalog number: 10017618)
- 53 21. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (沪试, catalog number: 20032118)

## 54 仪器设备

- 55 1. 盖玻片
- 56 2. 载玻片
- 57 3. 打孔器
- 58 4. 纱布
- 59 5. 无纺布

- 60 6. 10 ml 注射器
- 61 7. 250 ml 锥形瓶
- 62 8. 涂布棒
- 63 9. 漏斗
- 64 10. 镊子
- 65 11. 直尺
- 66 12. 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜
- 67 13. 50 ml 离心管
- 68 14. 电泳仪 (六一, model: DYY-6C)
- 69 15. 全温振荡器 (培英, model: THZ-C-1)
- 70 16. 生化培养箱 (博讯, model: SPX-250B-Z)
- 71 17. 台式高速冷冻离心机 (Sigma, model: 3K15)
- 72 18. 电热鼓风干燥箱 (新诺, model: 101-0AS)
- 73 19. 立式压力蒸汽灭菌器 (申安, model: LDZF-50KB-II)
- 74 20. 激光共聚焦荧光显微镜 (Carl Zeiss, model: LSM700)
- 75 21. PCR 扩增仪 (BIO RAD, model: MyCycler™ Thermal Cycler)
- 76 22. 光学显微镜 (Carl Zeiss, model: Axio Scope A1)

77

## 78 实验步骤

### 79 一. 原生质体的制备及再生

#### 80 1. 原生质体制备

81 1.1 以 0.5 M 蔗糖溶液作为渗透压稳定剂配置浓度为 10  $\mu\text{g/ml}$  的裂解酶溶液 20  
82 ml, 先以 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌, 再以 0.22 $\mu\text{m}$  滤膜二次过滤除菌后转移至  
83 50 ml 离心管中备用。

84 1.2 用 6 mm 打孔器取 10 个菌丝块接种至 100 ml 的 YMG 液体培养基中, 25  
85  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 避光培养 7 d, 然后以四层纱布过滤收集菌丝体, 用无菌水洗  
86 涤三次, 再用 0.5 M 蔗糖溶液洗涤一次。

1.3 将洗净后的菌丝体置于 10  $\mu\text{g/ml}$  的裂解酶溶液中使用手持式搅拌机打碎，使其均匀分布 (1 g 菌丝/5 ml 酶液)，于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、70-80 r/min 条件下震荡酶解 3 h。

1.4 酶解后将菌丝酶解液经无纺布过滤，得到较纯的原生质体初悬液，将所得滤液在 4  $^{\circ}\text{C}$  下 3000 r/min 离心 10 min，弃上清，得到原生质体沉淀；用 0.5 M 蔗糖溶液冲洗 2 次，弃上清，保留沉淀。

1.5 用 1 ml 0.5 M 蔗糖溶液重悬沉淀。

1.6 将得到的原生质体重悬液置于光学显微镜下进行镜检，用血球计数板计数并记录拍照原生质体形态。

## 2. 原生质体的再生

2.1 将 100  $\mu\text{l}$  原生质体重悬液均匀涂布于 MYG 再生培养基上，25  $^{\circ}\text{C}$  避光培养，每天观察菌落生长情况。

2.2 挑取 10 d 后长出的再生单菌落转接至 PDA 固体培养基上，25  $^{\circ}\text{C}$  避光条件下培养 14 d 后即可获得原生质体再生菌株，一次挑选 10 株为宜。

## 二. 原生质体再生菌株的鉴定

### 1. 再生菌株与出发双核体菌落的培养特征比较分析

1.1 菌落形态特征观察，用打孔器沿再生菌株、出发菌株的菌落边缘打孔，分别接种于 PDA 固体培养基中心，置于 25  $^{\circ}\text{C}$  培养箱，避光培养 12 d 后观察菌落表型特征 (包括菌落正反面及边缘特征、色素、生长速度等)，并拍照记录。

1.2 再生菌株与出发菌株生长速度测定，用打孔器沿原生质体再生菌落、出发菌落的边缘打孔，分别接种至 PDA 固体培养基中心，25  $^{\circ}\text{C}$  避光培养，以十字交叉法测量菌落直径，计算菌丝的生长速度 (mm/d)，每个菌株设置 3 次生物学重复。

### 2. 再生菌株与出发双核体菌株的显微形态比较分析

2.1 菌丝形态观察，用打孔器沿原生质体再生菌落、出发菌落的边缘打孔，分别接种至 PDA 固体培养基中心，25  $^{\circ}\text{C}$  避光培养 3 d，在菌落边缘斜插入无菌盖玻片，待菌丝延伸至盖玻片的 2/3 处时，在无菌条件下取出盖玻片，制片后

置光学显微镜下镜检，100×油镜下观察两类菌株的菌丝是否存在锁状联合结构。

2.2 细胞核荧光染色及观察，参考胡晓棣等 (2016) 的方法并稍作改动。用镊子取出经插片培养后附着有菌丝体的盖玻片，擦去背面菌丝，向菌丝附着位置均匀滴加 50  $\mu$ l DAPI 染色液，避光条件下对再生菌株、出发菌株的菌丝进行细胞核染色 3-5 min，然后用磷酸盐缓冲液 (PBS) (pH 6.8, 0.1 M) 洗涤 3 次。将带有菌落一侧盖玻片朝下，盖到滴有 PBS 缓冲液 (pH 6.8, 0.1 mol/L) 的载玻片上，置于荧光显微镜下镜检 (激发光与发射光波长分别为 340、488 nm)。

### 3. 基因杂合位点鉴定

3.1 用真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒分别提取荷伯生氏斜盖伞再生菌株、出发菌株的基因组 DNA。

3.2 采用 *fRPB2-5F/fRPB2-7cR* 和 983F/2218R 两对引物分别扩增 *rpb2* (Liu 等, 1999) 和 *tef-1 $\alpha$*  (Rehner 和 Buckley 2005) 基因片段。PCR 扩增体系 (50  $\mu$ l) 如下: 25  $\mu$ l 1-5<sup>TM</sup>2x High-Fidelity Master Mix, 1  $\mu$ l 模板 DNA (10-20 ng/ $\mu$ L), 上下游引物各 2  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L), 加 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O。 *rpb2* 基因 PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 40 s, 55 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 共扩增 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。采用降落 PCR (touch-down PCR) 方法扩增 *tef-1 $\alpha$*  基因, 降落 PCR 程序参考 Kluting 等 (2014) 的方法并稍作改动: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 40 s, 66 °C 退火 50 s, 每循环下降 1 °C, 72 °C 延伸 1.5 min, 10 个循环; 94 °C 变性 40 s, 56 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 共扩增 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

3.3 PCR 扩增产物经 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳检测出条带后送擎科生物科技有限公司进行测序。采用 SeqMan v.5.0 软件分别对再生菌株、出发菌株的 *rpb2* 基因和 *tef* 基因进行核酸序列比对和双峰杂合位点鉴定。

### 结果与分析

本实验通过酶解实验成功获得了荷伯生氏斜盖伞的原生质体，经再生培养可观察到两种形态的菌落：一类表现为菌丝快速萌发（大多出现在再生培养前期），菌丝形态略稀疏且呈毛毡状，菌落边缘放射状，与出发菌株的菌落并无明显差异（图 1B）；另一类表现为菌丝缓慢萌发（大多出现在再生培养后期），菌丝形态浓白且呈绒毛状，菌落边缘明显，与出发菌落形态差异较大（图 1C），该类型菌落体可能是潜在的单核体菌落。

以其中一株菌落特征具有较明显差异的再生菌株为材料，比较该菌株与出发菌株的菌落形态特征和生长速度差异：培养结果表明再生菌株呈辐射状生长，菌丝呈浓密绒毛状，在平板反面形成裂褶状纹路并有深黄色色素分泌（图 2A）（表 1）。而出发菌株生长呈现轮纹状扩大，菌丝稀疏毛毡状，无裂痕特征，有淡黄色色素分泌（图 2B）。此外，出发菌株的菌丝生长速度为  $5.72 \pm 0.07$  mm/d，再生菌株的菌丝生长速度为  $2.82 \pm 0.03$  mm/d，显著低于出发菌株的菌丝生长速度（表 1）。

锁状联合结构是双核体担子菌特有的菌丝结构，通常作为双、单核体担子菌的鉴定依据（丛倩倩等 2019；徐思佳等 2020）。然而，镜检结果表明，本研究中出发菌株与再生菌株的菌丝中均未发现锁状联合结构（图 3），这与 Singer (1986) 研究结果一致。此外，DAPI 染色结果表明，再生菌株的菌丝中相邻细胞核之间被隔膜分开，每个菌丝细胞中仅有一个细胞核（图 4A），而出发菌株的菌丝细胞中含有两个明显可见的细胞核（图 4B）。据此可判断本研究所获得菌株为单核体。

由于异核体菌株基因型杂合，因此在基因 Sanger 测序峰图中通常会出现套峰，即存在杂合位点；而单核体菌株基因型理论上应该是纯合的（Huang 等，2010），不存在杂合位点。通过对 *rpb2* 和 *tef-1 $\alpha$*  基因片段序列峰图比对发现，出发菌株存在多个杂合位点，尤其是 *rpb2* 基因（图 5A；图 5C）；而再生菌株均未发现杂合位点（图 5B；图 5D）。



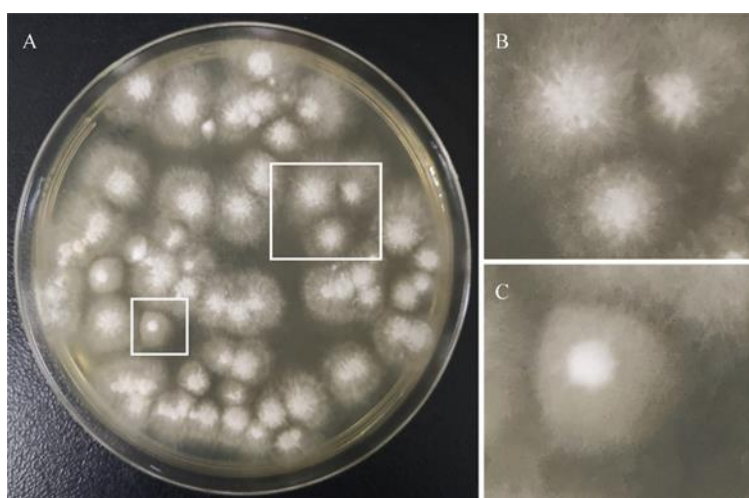


图 1. 原生质体再生菌落形态

注：A：再生菌落；B：再生菌落类型 I；C：再生菌落类型 II。

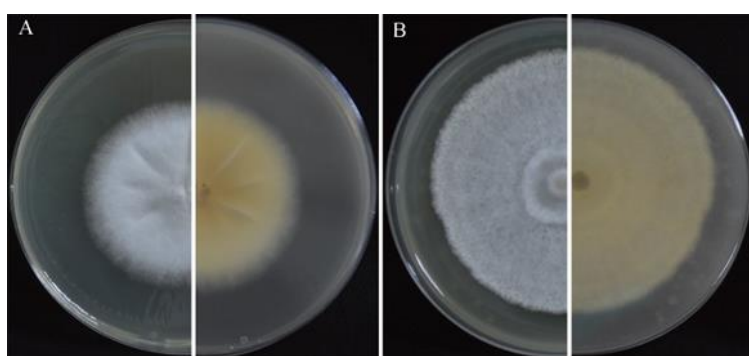


图 2. 荷伯生氏斜盖伞再生菌株与原出发双核体菌株菌落形态

注：A：再生菌株菌落（正、反）；B：出发菌株菌落（正、反）。

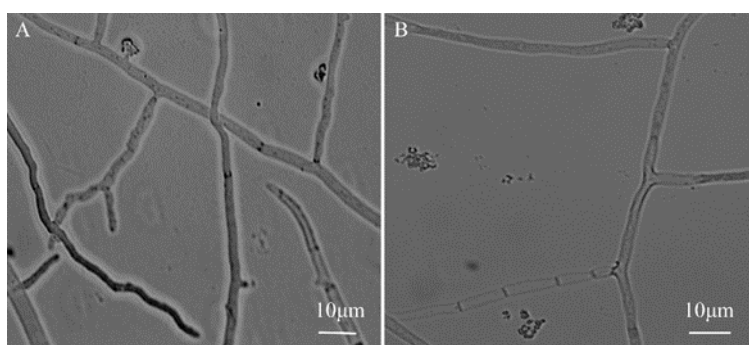


图 3. 荷伯生氏斜盖伞再生菌株与原出发双核体菌株菌丝显微形态

注：A：再生菌株；B：出发菌株。

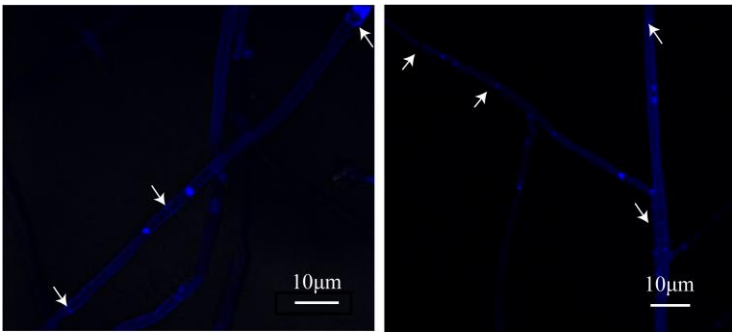


图 4. 荷伯生氏斜盖伞再生菌株与原出发双核体菌株细胞核染色

注：A：再生菌株；B：出发菌株。箭头：隔膜。

表 1. 再生菌株与出发菌株的生长特征比较

菌株材料	菌落生长速度（mm/d）	菌丝致密程度
再生菌株	2.82±0.03 <sup>b</sup>	+++
出发菌株	5.72±0.07 <sup>a</sup>	+

注：t 检验进行差异显著性分析，小写字母表示数据间差异显著， $P<0.01$ ；“+++”表示菌丝浓密，“+”表示菌丝稀疏。

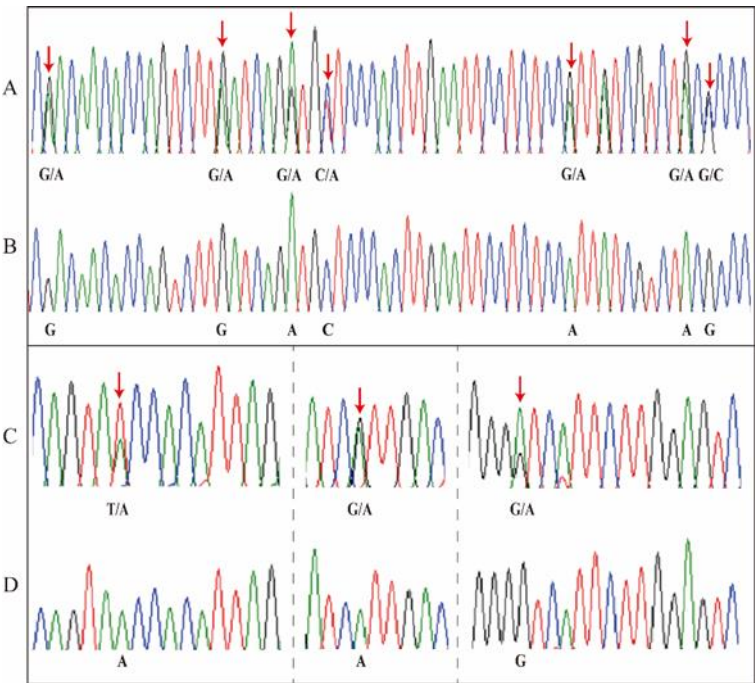


图 5. *rpb2*、*tef-1α* 基因部分序列比对

溶液配方



190 1. PDA 培养基

191 马铃薯 200 g (去皮煮熟后过滤取汁液)

192 葡萄糖 20 g

193 琼脂 15 g

194 加超纯水至 1 L, 调 pH 至 7.0, 115 °C 高温高压灭菌 30 min

195 2. YMG 液体培养基

196 葡萄糖 10 g

197 酵母提取物 4 g

198 麦芽提取物 10 g

199 加超纯水至 1 L, 调 pH 至 7.0, 115 °C 高温高压灭菌 30min

200 3. MYG 再生培养基

201 葡萄糖 10 g

202 酵母提取物 4 g

203 麦芽提取物 10 g

204 琼脂 15 g

205 加 0.5 M 蔗糖溶液至 1 L, 调 pH 至 7.0, 115 °C 高温高压灭菌 30min

206 4. DAPI 染色液

207 用无菌水将 DAPI 配制成 50 µg/ml 的母液, -20 °C 条件下保存

208 染色时, 用 PBS 缓冲液 (pH = 6.8, 0.1 M) 稀释成 5 µg/ml 的工作液, 4 °C、

209 避光条件下使用

210 5. 0.1 M 磷酸盐缓冲液 (PBS)

211 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  510 ml

212 0.1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  490 ml

213 NaCl 8 g, pH = 6.8

214 6. 裂解酶

215 用 0.5 M 蔗糖溶液配制浓度为 10 µg/ml 的裂解酶溶液, 先以 0.45 µm 滤膜过滤

216 除菌, 再以 0.22µm 滤膜二次过滤除菌。

217 7. 0.5 M 蔗糖溶液

218 蔗糖 171.5 g

加超纯水至 1 L, 以 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌再以 0.22 $\mu\text{m}$  滤膜二次过滤除菌。

## 致谢

本工作得到国家自然科学基金项目 (项目编号: 31722014; 31901290) 的经费资助。

## 参考文献

1. 丛倩倩, 崔晓, 王庆武. (2019). [灵芝原生质体单核菌株的制备及形态特性比较](#). *食用菌* 41(2): 34-36.
2. 胡晓棣, 李熠, 任蜀豫, 姚一建. (2016). [冬虫夏草、蛹虫草菌丝隔膜和细胞核荧光染色](#). *菌物学报* 35(9): 1099-1105.
3. 徐思佳, 万佳宁, 李焱, 李燕, 尚俊军, 鲍大鹏. (2020). [刺芹侧耳交配型基因敲入单核体后锁状联合和核相的表征观察](#). *菌物学报* 39(6): 1130-1138.
4. Huang, C., Xu, J., Gao, W., Chen, Q., Wang, H. and Zhang, J. (2010). [A reason for overlap peaks in direct sequencing of rRNA gene ITS in \*Pleurotus nebrodensis\*](#). *FEMS Microbiology Letters* 305(1): 14-17.
5. Kluting, K.L., Baroni, T.J. and Bergemann, S. E. (2014). [Toward a stable classification of genera within the Entolomataceae: a phylogenetic re-evaluation of the \*Rhodocybe-Clitopilus\* clade](#). *Mycologia* 106(6): 1127-1142.
6. Liesche, J., Ziomkiewicz, I. and Schulz, A. (2013). [Super-resolution imaging with Pontamine Fast Scarlet 4BS enables direct visualization of cellulose orientation and cell connection architecture in onion epidermis cells](#). *BMC Plant Biology* 13: 226-226.
7. Liu, Y. J., Whelen, S. and Hall, B. D. (1999). [Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit](#). *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799-1808.
8. Rehner, S. A. and Buckley, E. (2005). [A \*Beauveria\* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- \$\alpha\$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to \*Cordyceps teleomorphs\*](#). *Mycologia* 97: 84-98.
9. Singer, R. (1986). [The Agaricales in modern taxonomy](#). In: *Koeltz Scientific Books*. 4th edition. Germany, Koenigstein. 699-700.