

## 生防真菌球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)的原生质体制备条件优化与外源基因表达

叶丽丹<sup>1, 2</sup>, 卢建平<sup>1, 2</sup>, 刘小红<sup>1, 2</sup>, 林福呈<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>浙江大学生物技术研究所, 杭州, 310029

<sup>2</sup>浙江大学生命科学学院, 杭州, 310029

\*E-mail: [fuchenglin@zju.edu.cn](mailto:fuchenglin@zju.edu.cn), Tel: 0571-86971185

■热门文章

■最新更新

球毛壳菌作为一种有效的生防真菌,能对多种植物病原真菌产生拮抗作用。文献报道,毛壳菌可预防谷物秧苗的枯萎病、甘蔗猝倒病,降低由镰刀菌引起的茄枯萎病、黑星菌引起的苹果斑点病等的发病率,且对立枯病丝核菌、甘蓝格链孢、拟茎点霉属、毛盘孢属、葡萄孢属等病原菌的生长有一定的抑制作用,对山木根腐病(*Fusarium acuminatum*)、小麦斑枯病(*Cochliobolus sativus*)也有明显的拮抗作用。对于这种重要的生防真菌,历年来研究重点主要集中于其抗生素物质的合成及活性方面,而对其转基因方面的报道鲜少见。而原生质体则是真菌基因改造的重要起始材料之一。真菌原生质体技术已经广泛应用于原生质体融合、转基因、染色体组型、遗传和生理分析、性状定向筛选等领域。尤其原生质体介导的基因转化是当前真菌基因工程中普遍采用的方法。而球毛壳菌的原生质体制备和再生条件的报道仅见国内一例,且再生率较低,为29.11%,显然不足以满足后续的研究要求。本研究目的在于提出一种高效的原生质体制备和外源基因表达的方案,以便于后续的基因工程研究。

首先,从菌龄、裂解缓冲液、裂解酶类型及其组合、酶解时间及温度、渗透压缓冲液等影响因素着手,优化原生质体产量。然后,又从再生培养基类型、渗透压稳定剂(分为添加到酶解液中和添加到再生培养基中两类)、酶解时间入手,优化了原生质体再生条件。最终得到原生质体产量为 $10^7/0.1g$ ,再生率高达62.93%。利用二乙酰荧光素染色,荧光镜检原生质体活率,发现原生质体活率高于98%。

利用PEG-CaCl<sub>2</sub>介导的方法以质粒pBES和pESL(均含有eGFP报告基因和SUR抗性基因)转化原生质体,在SUR筛选平板上得到候选转化子。随机挑取8个转化子,以CTAB法提取基因组,以野生型菌株为阴性对照,以pCB1532(含SUR基因)和pEGFP(含eGFP基因)为阳性对照,分别进行PCR扩增和Southern blot,以此验证SUR基因和eGFP基因插入转化子基因组。并在荧光显微镜下,观察GFP表达,进一步验证eGFP基因的插入与表达。PCR与杂交结果表明,8个转化子基因组中均含有一至多个拷贝的SUR基因和eGFP基因。而荧光镜检则表明其中一个转化子中eGFP在菌丝和子囊孢子中得到较强的表达。

球毛壳菌原生质体制备和再生条件的优化将为这种生防真菌进一步的遗传改造和应用提供便利。而抗性基因和报告基因的验证成功不仅说明了这个原生质体制备方案的可行性,同时也分别为今后在植病生防中的广泛应用和跟踪剖析球毛壳菌与病原菌的拮抗机理提供了基础。

关键词: 球毛壳菌, 原生质体制备, 转化, 验证, 抗性基因, GFP表达

编辑: 作者: 来源: 加入日期: 2006-1-4 15:01:

[发送给好友](#)

### ■相关链接

- [对稻曲病菌T-DNA插入突变体若干生物学性状的分析](#)
- [中国番茄黄化曲叶病毒DNAB缺失突变体与异源病毒的互作研究](#)
- [常见杀菌剂的药害及其控制](#)
- [弱筋小麦不同栽培条件与赤霉病的发生](#)
- [西瓜炭疽病菌Colletotrichum orbiculare的分子检测\\*](#)
- [烯唑醇对辣椒和番茄的影响](#)
- [农杆菌介导的黄瓜炭疽菌遗传转化](#)
- [三种百合线状病毒的外壳蛋白抗血清制备\\*](#)

