

草菇原生质体制备、再生及转化研究

王 杰, 林俊芳, 云慧芬, 张 凯, 郭丽琼

(华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642)

摘要:用酶解法对草菇原生质体制备及再生条件进行了研究. 结果表明: 液体静置培养4 d的菌丝, 以0.6 mol/L的甘露醇作渗透压稳定剂, 溶壁酶质量浓度15 mg/mL, 34 ℃下酶解3 h, 原生质体制备率最高; 草菇原生质体预培养16 h后涂布在再生培养基上, 再生率最高. 同时, 采用PEG法将潮霉素抗性基因转入草菇的原生质体中, 经过抗性筛选, 得到了具有潮霉素抗性的草菇转化子.

关键词:草菇; 原生质体制备; 原生质体再生; 原生质体转化

中图分类号:S646.130.1

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)03-0119-03

Studies on Preparation, Regeneration and Transformation of the Protoplasts of *Volvariella volvacea*

WANG Jie, LIN Jun-fang, YUN Hui-fen, ZHANG Kai, GUO Li-qiong

(College of Food Sciences, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The conditions for *Volvariella volvacea* protoplast preparation and regeneration were studied by lywallzyme digestion. The results showed that the highest yield of *V. volvacea* protoplast was obtained with the mycelia of static cultivation for 4 d by using 15 mg/mL lywallzyme digestion for 3 h at 34 ℃ and 0.6 mol/L mannitol as osmotic pressure stabilizer. The highest regeneration rate was gained on PDA plates after the pre-incubation in liquid regeneration media for 16 h. The transformants of *V. volvacea* resistant to hygromycin were obtained after screening on the selection medium by using PEG-mediated protoplast transformation with the *hpt* gene.

Key words: *Volvariella volvacea*; protoplast preparation; protoplast regeneration; protoplast transformation

草菇是世界上重要的栽培食用菌, 其复杂的遗传背景, 给品种改良带来较大的难度. 基因工程的发展, 为解决这一难题提供了新的途径. 目前, 食用菌的遗传转化过程大多数以原生质体为基础, 已有多例成功的报道^[1-4]. 原生质体的质量决定着最终的转化效率. 本文对草菇原生质体的制备及再生条件进行了优化, 并用PEG法将潮霉素抗性基因转入草菇中, 为今后草菇的基因工程改良提供了研究基础.

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

草菇 V51 菌株购于上海市农科院食用菌研究

所; 质粒 pAN7-1 为 Warwick University 的 Doc. Mike Challen 赠送; PDSA 培养基、再生培养基 (PDSA 中加入渗透压稳渗剂, 终浓度为 0.6 mol/L); 溶壁酶购自广东省微生物研究所; 潮霉素磷酸转移酶 (Hyg B) 购自美国 Sigma 公司; 甘露醇、山梨醇、蔗糖、硫酸镁、氯化钾、氯化钠均为市售分析纯.

1.2 菌丝的培养

1.2.1 静置液体培养 固体斜面培养 6 d 的菌丝接种于 50 mL PDSA 培养基中, 34 ℃ 静置培养 4 d.

1.2.2 平板培养 固体斜面培养 6 d 的菌丝接种于固体 PDSA 板上, 34 ℃ 培养 5 d.

1.2.3 摇瓶培养 菌丝于固体斜面培养 6 d 后接种

收稿日期: 2006-10-15

作者简介: 王 杰 (1978—), 女, 博士; 通讯作者: 郭丽琼 (1963—), 女, 教授, 博士, E-mail: guolq@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30371000, 39960050); 广东省科技计划项目 (2004B20101001); 广东省自然科学基金 (5006680, 032239)

表2 不同烟粉虱卵密度(粒·cm⁻²)下的最适抽样数
Tab. 2 Optimum sampling numbers at different *B. tabaci* egg densities

允许误差 error(<i>D</i>)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0.05	255	212	198	191	186	184	182	180	179	178
0.10	64	53	50	48	47	46	45	45	45	44
0.20	16	13	12	12	12	12	11	11	11	11

不同卵密度情况下最适抽样数见表2. 从表2可以看出, 在同一允许误差水平下, 随着种群密度的增加, 抽样数逐渐减少; 在同一密度水平条件下, 允许误差越大, 所需抽样数越少.

3 讨论与结论

烟粉虱近年来已成为我国蔬菜和园林植物上的重要害虫^[5-6], 本文对烟粉虱卵在黄瓜上的空间分布规律进行了研究. 结果表明, 在所有密度情况下, 烟粉虱卵在黄瓜植株上均呈聚集分布, 其聚集度随着种群密度的升高而减弱, 这可能与烟粉虱成虫在黄瓜上呈聚集分布的生态学特性有关^[7].

在烟粉虱种群数量调查、组建由作用因子组配的烟粉虱自然种群生命表^[13]、建立烟粉虱种群动态数学模型等生态学研究过程中, 都要调查烟粉虱卵的数量, 从而正确估计田间卵的密度, 这就涉及到如何抽样、抽样数量等问题, 本研究结果有助于解决这个问题. 例如, 在组建烟粉虱自然种群生命表的调查过程中, 一般可以允许误差 $D = 0.10$, 这样就可以确定不同烟粉虱卵密度下的田间最适抽样调查数.

参考文献:

[1] 张芝利. 关于烟粉虱大发生的思考[J]. 北京农业科学, 2000, 18(增刊): 1-3.
[2] 宫亚军, 路虹. 烟粉虱的危害、生物型及有关生物化学的研究进展[J]. 北京农业科学, 2000, 18(增刊): 14-19.
[3] 周尧. 中国昆虫名录[J]. 中国昆虫学杂志, 1949, 3

(4): 1-18.
[4] 罗志义, 章伟年, 干国培. 棉田烟粉虱种群动态及杀虫剂的影响[J]. 昆虫学报, 1989, 32(3): 293-299.
[5] 张芝利, 罗晨. 我国烟粉虱的发生危害和防治对策[J]. 植物保护, 2001, 27(2): 25-30.
[6] 任顺祥, 王振中, 李学文. 南方棚室蔬菜病虫害综合防治技术研究[J]. 华南农业大学学报, 1999, 20(增刊): 67-71.
[7] 沈斌斌, 任顺祥, MUSA P D, 等. 烟粉虱成虫空间分布型的研究[J]. 昆虫知识, 2005, 42(5): 544-546.
[8] NARANJO S E, FLINT H M. Spatial distribution of adult *Bemisia tabaci* in cotton and development and validation of fixed-precision sampling plans for estimating population density [J]. Environmental Entomology. 1995, 24: 261-270.
[9] LYNCH R E, SIMMONS A M. Distribution of immature and monitoring of adult sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*, in peanut, *Arachis hypogaea* [J]. Environmental Entomology. 1993, 22: 375-380.
[10] TONHASCA A JR, PALUMBO J C, BYRNE B N. Distribution patterns of *Bemisia tabaci* in cantaloupe fields in Arizona [J]. Environmental Entomology. 1994, 23: 949-954.
[11] 徐汝梅. 昆虫种群生态学[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1985: 7-60.
[12] 丁岩钦. 昆虫数学生态学[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 45-47.
[13] 沈斌斌, 陈超, 任顺祥. 不同季节黄瓜上烟粉虱自然种群生命表研究[J]. 应用生态学报, 2005, 16(2): 2473-2475.

【责任编辑 周志红】