

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620060153295

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

根癌农杆菌介导的生防真菌淡紫拟青霉
(*Paecilomyces lilacinus*) 的遗传转化

Genetic transformation of
biological control fungus *Paecilomyces lilacinus*
mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

王 阶 平

指导教师姓名: 潘 沧 桑 教授

专业名称: 动 物 学

论文提交日期: 2009 年 7 月 24 日

论文答辩日期: 2009 年 9 月 9 日

学位授予日期: 2009 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 9 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：王阶平

2009年9月24日



厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

() 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

() 2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人（签名）：王阶平

2009 年 9 月 24 日

中文摘要	i
Abstract	iii
英文缩写说明	v
第一章 前言.....	1
1 生防真菌淡紫拟青霉的研究进展	1
1.1 淡紫拟青霉的生物学研究	1
1.1.1 分类学地位	1
1.1.2 形态学特征	1
1.1.3 生长繁殖特性	3
1.1.4 遗传学和分子生物学研究	6
1.2 淡紫拟青霉的控害作用	8
1.2.1 防治植物病原线虫	8
1.2.2 对昆虫的防治作用	13
1.2.3 对动物寄生虫的防治作用	14
1.2.4 对植物病原菌的防治作用	14
1.3 淡紫拟青霉的其他功效	15
1.3.1 促进植物生长	15
1.3.2 降解效应	15
1.4 淡紫拟青霉的安全性	16
1.4.1 淡紫拟青霉的致病性与毒性	16
1.4.2 淡紫拟青霉的生态安全性	18
1.5 结语	19
2 丝状真菌遗传转化的研究进展	20
2.1 选择性标记与转化载体	20
2.2 转化方法	23
2.3 根癌农杆菌介导的丝状真菌遗传转化的研究概况和进展	26

2.3.1 根癌农杆菌介导遗传转化的丝状真菌的种类	26
2.3.2 根癌农杆菌介导真菌遗传转化的机理	28
2.3.3 根癌农杆菌介导的丝状真菌转化的特点	30
2.3.4 根癌农杆菌介导丝状真菌转化的基本步骤	32
2.3.5 影响根癌农杆菌介导的丝状真菌遗传转化效率的因素	34
2.3.6 根癌农杆菌介导丝状真菌遗传转化的应用	36
2.4 展望	38
3 本研究的立题意义和研究内容	39
第二章 根癌农杆菌介导的淡紫拟青霉遗传转化体系的建立——以	
G418 抗性基因作为筛选标记	41
1 实验材料	43
2 实验方法	44
3 结果	56
3.1 转化前淡紫拟青霉 9410 菌株对潮霉素和 G418 的敏感性分析	56
3.2 真菌表达载体 pUPNT 的构建	56
3.2.1 重组质粒 pcDNA3.1(-)-PgpdA 的构建	56
3.2.2 重组质粒 pcDNA3.1(-)-PgpdA- npt II 的构建	58
3.2.3 重组质粒 pcDNA3.1(-)-PgpdA- npt II -TtrpC 的构建	60
3.2.4 真菌表达载体 pUPNT 的构建	63
3.3 真菌表达载体对根癌农杆菌的转化	63
3.4 根癌农杆菌介导的淡紫拟青霉遗传转化体系的建立	65
3.4.1 转化条件的优化	65
3.4.1.1 不同根癌农杆菌菌株对转化的影响	65
3.4.1.2 乙酰丁香酮对转化的影响	65
3.4.1.3 不同共培养方式对转化的影响	66
3.4.1.4 共培养温度对转化的影响	67
3.4.1.5 共培养时间对转化的影响	67
3.4.1.6 分生孢子初始浓度对转化的影响	68
3.4.1.7 根癌农杆菌初始菌液量对转化的影响	69

3.4.1.8 不同分生孢子类型对转化的影响	69
3.4.2 最高转化率的测定	70
3.5 淡紫拟青霉转 <i>npt</i> II 化子的鉴定	70
3.5.1 淡紫拟青霉菌基因组 DNA 的提取.....	70
3.5.2 淡紫拟青霉 <i>npt</i> II 转化子的 PCR 检测.....	71
3.6 淡紫拟青霉 <i>npt</i> II 转化子的 Southern-blot 分析	72
3.7 淡紫拟青霉 <i>npt</i> II 转化子抗性的遗传稳定性分析	72
3.8 淡紫拟青霉 <i>npt</i> II 转化子的形态学观察	73
3.8.1 淡紫拟青霉 <i>npt</i> II 转化子在 PDA 平板的菌落形态观察	73
3.8.2 淡紫拟青霉 <i>npt</i> II 转化子菌丝体的苯胺蓝染色与形态观察	73
3.9 淡紫拟青霉 <i>npt</i> II 转化子对线虫卵粒的寄生能力的检验	74
4 讨论	76
5 小结	84
第三章 淡紫拟青霉 9410 菌株丝氨酸蛋白酶基因的克隆与过量表达	
.....	85
1 实验材料	87
2 实验方法	87
3 结果	95
3.1 淡紫拟青霉 9410 菌株的 <i>mSP</i> 基因的克隆	95
3.1.1 <i>mSP</i> 基因的 cDNA 的克隆	95
3.1.2 <i>mSP</i> 基因的 gDNA 的克隆	97
3.2 重组质粒 pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> -NPTL 的构建	99
3.3 重组质粒 pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> -NPTL- <i>mSP</i> 的构建	101
3.4 重组质粒 pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> -NPTL- <i>mSP</i> - <i>TtrpC</i> 的构建	102
3.5 真菌表达载体 pUPNST 的构建.....	103
3.6 真菌表达载体对根癌农杆菌的转化	103
3.7 根癌农杆菌介导的 <i>mSP</i> 基因 cDNA 对淡紫拟青霉的遗传转化	104
3.8 淡紫拟青霉 <i>mSP</i> 转化子的鉴定	104
3.8.1 淡紫拟青霉 <i>mSP</i> 转化子基因组 DNA 的提取	105
3.8.2 淡紫拟青霉 <i>mSP</i> 转化子的 PCR 检测	105

3.9 淡紫拟青霉 <i>mSP</i> 转化子的 Southern-blot 分析	106
3.10 淡紫拟青霉 <i>mSP</i> 转化子抗性的遗传稳定性分析	107
3.11 淡紫拟青霉 <i>mSP</i> 转化子的形态学观察	107
3.11.1 淡紫拟青霉 <i>mSP</i> 转化子在 PDA 平板的菌落形态观察	107
3.11.2 淡紫拟青霉 <i>mSP</i> 转化子菌丝体的苯胺蓝染色与形态观察	108
3.12 淡紫拟青霉 <i>mSP</i> 转化子的半定量 RT-PCR 分析	109
3.13 淡紫拟青霉 <i>mSP</i> 转化子蛋白酶的活性分析	110
3.14 淡紫拟青霉 <i>mSP</i> 转化子的卵寄生能力的检验	112
4 讨论	114
5 小结	119
第四章 透明颤菌血红蛋白 <i>vgb</i> 基因对淡紫拟青霉的遗传转化	120
1 实验材料	123
2 实验方法	123
3 结果	131
3.1 <i>vgbpl</i> 基因的人工设计与构建	131
3.2 重组质粒 pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> - <i>NPTL</i> - <i>vgbpl</i> 的构建	132
3.3 重组质粒 pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> - <i>NPTL</i> - <i>vgbpl</i> - <i>TtrpC</i> 的构建	133
3.4 真菌表达载体 pUPNVT 的构建	134
3.5 真菌表达载体对根癌农杆菌的转化	135
3.6 根癌农杆菌介导的 <i>vgbpl</i> 基因对淡紫拟青霉的遗传转化	136
3.7 淡紫拟青霉 <i>vgbpl</i> 转化子的鉴定	136
3.7.1 淡紫拟青霉 <i>vgbpl</i> 转化子基因组 DNA 的提取	137
3.7.2 淡紫拟青霉 <i>vgbpl</i> 转化子的 PCR 检测	137
3.8 淡紫拟青霉 <i>vgbpl</i> 转化子的 Southern-blot 分析	138
3.9 淡紫拟青霉 <i>vgbpl</i> 转化子抗性的遗传稳定性分析	138
3.10 淡紫拟青霉 <i>vgbpl</i> 转化子的形态学观察	139
3.10.1 淡紫拟青霉 <i>vgbpl</i> 转化子在 PDA 平板的菌落形态观察	139
3.10.2 淡紫拟青霉 <i>vgbpl</i> 转化子菌丝体的苯胺蓝染色与形态观察	140
3.11 淡紫拟青霉 <i>vgbpl</i> 转化子 <i>vgbpl</i> 基因的 mRNA 表达的 RT-PCR 分析	140
3.12 淡紫拟青霉 <i>vgbpl</i> 转化子 VHb 表达的 CO 结合试验	141

3.13 淡紫拟青霉 <i>vgbpl</i> 转化子的卵寄生能力的检验	142
3.14 淡紫拟青霉 <i>vgbpl</i> 转化子胞外蛋白酶的活性分析	143
3.15 淡紫拟青霉 <i>vgbpl</i> 转化子的生产性能	144
3.15.1 液体培养的生产性能	144
3.15.2 固体培养的产孢能力	148
4 讨论	149
5 小结	153
第五章 增强型绿色荧光蛋白基因对淡紫拟青霉的遗传转化	154
1 实验材料	158
2 实验方法	158
3 结果	161
3.1 重组质粒 pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> - <i>NPTL-egfp</i> 的构建	161
3.2 重组质粒 pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> - <i>NPTL-egfp-TrpC</i> 的构建	163
3.3 真菌表达载体 pUPNGT 的构建	163
3.4 真菌表达载体 pUPNGT 对根癌农杆菌的转化	164
3.5 根癌农杆菌介导的 <i>egfp</i> 基因对淡紫拟青霉的遗传转化	165
3.6 淡紫拟青霉 eGFP 转化子的鉴定	166
3.6.1 淡紫拟青霉 eGFP 转化子基因组 DNA 的提取	166
3.6.2 淡紫拟青霉 eGFP 转化子的 PCR 检测	166
3.7 淡紫拟青霉 eGFP 转化子的 Southern-blot 分析	167
3.8 淡紫拟青霉 eGFP 转化子抗性的遗传稳定性分析	167
3.9 淡紫拟青霉 eGFP 转化子的形态学观察	168
3.9.1 淡紫拟青霉 eGFP 转化子在 PDA 平板的菌落形态观察	168
3.9.2 淡紫拟青霉 eGFP 转化子菌丝体的苯胺蓝染色与形态观察	168
3.10 淡紫拟青霉 eGFP 转化子的荧光显微镜观察	169
4 讨论	171
5 小结	174
第六章 淡紫拟青霉 <i>nptII</i> 转化子在烟草根际的定殖研究与土壤中 <i>nptII</i> 转化子的 PCR 检测	175

1 实验材料	177
2 实验方法	177
3 结果	181
3.1 烟草育苗	181
3.2 淡紫拟青霉菌剂的制备	181
3.3 盆栽试验	181
3.4 淡紫拟青霉原始菌株和 <i>npt II</i> 转化子 NPT11、NPT13 的定殖分析	182
3.5 土壤混合真菌总 gDNA 的提取与真菌 28s rDNA 的 PCR 扩增	185
3.6 PCR 检测土壤中的淡紫拟青霉 <i>npt II</i> 转化子	187
4 讨论	190
5 小结	192
全文总结	193
参考文献	196
致谢	213

Contents

Chinese abstract	i
Abstract	iii
Note of English abbreviation	v
Chapter 1 Introduction	1
1 Advances of research on biological control fungus <i>Peacilomyces lilacinus</i>	1
1.1 Biology research of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	1
1.1.1 Taxonomical status	1
1.1.2 Morphological characteristics.....	1
1.1.3 Growth and reproduction characteristics	3
1.1.4 Genetics and molecular biology research	6
1.2 Biological control function of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	8
1.2.1 Control phytopathogen nematodes	8
1.2.2 Control insects	13
1.2.3 Control animals parasite	14
1.2.4 Control phytopathogen microorganisms.....	14
1.3 Orther function of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	15
1.3.1 Promoting plant growth.....	15
1.3.2 Biodegradation.....	15
1.4 Security of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	16
1.4.1 Pathogenicity and toxicity of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	16
1.4.2 Ecological security of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	18
1.5 Conclusion.....	19
2 Advances of research on genetic transformation of filamentous fungi	20
2.1 Selection marker and transformation vector	20
2.2 Transformation method	23
2.3 Situation and advances of research on genetic transformation of filamentous fungi mediated by <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26

2.3.1 Species of filamentous fungi transformed by ATMT	26
2.3.2 Mechanism of genetic transformation of filamentous fungi by ATMT	28
2.3.3 Characteristics of genetic transformation of filamentous fungi by ATMT	30
2.3.4 Basic steps of genetic transformation of filamentous fungi by ATMT.....	32
2.3.5 Factors influencing transformation efficiency of genetic transformation of filamentous fungi by ATMT	34
2.3.6 Application of of genetic transformation of filamentous fungi by ATMT	36
2.4 Outlook	38
3 Significance and contents of this study	39
Chapter 2 Establishment of genetic transformation system of <i>Peacilomyces lilacinus</i> mediated by <i>Agrobacterium tumefaciens</i>: Resistant Gene of G418 as selection marker.....	41
1 MATERIALS.....	43
2 METHODS.....	44
3 RESULTS.....	56
3.1 Susceptibility analysis of <i>Peacilomyces lilacinus</i> 9410 strain to screening antibiotics before transforming.....	56
3.2 Construction of fungus expression vector pUPNT.....	56
3.2.1 Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i>	56
3.2.2 Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA-npt II</i>	58
3.2.3 Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA-npt II-TtrpC</i>	60
3.2.4 Construction of fungus expression vector pUPNT.....	63
3.3 Fungus expression vector transformed into <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	63
3.4 Establishment of genetic transformation system of <i>Peacilomyces lilacinus</i> mediated by <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	65
3.4.1 Optimization of transformation conditions.....	65
3.4.1.1 Effect of the different strain of <i>Agrobacterium</i> on efficiency of transformation	65
3.4.1.2 Effect of acetosyngone on efficiency of transformation	65
3.4.1.3 Effect of co-cultivation method on efficiency of transformation	66
3.4.1.4 Effect of co-cultivation teperature on efficiency of transformation	67
3.4.1.5 Effect of co-cultivation time on efficiency of transformation	67
3.4.1.6 Effect of initial concentration of conidia on efficiency of transformation.....	68

3.4.1.7 Effect of initial amount of <i>Agrobacterium</i> on efficiency of transformation ...	69
3.4.1.8 Effect of different conidia on efficiency of transformation.....	69
3.4.2 Determining of the highest efficiency of transformation	70
3.5 Identification of transformants of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	70
3.5.1 Extraction of genomic DNA from <i>Peacilomyces lilacinus</i>	70
3.5.2 PCR detection of transformants.....	71
3.6 Southern-blot analysis of transformants	72
3.7 Genetic stability testing of resistance of transformants.....	72
3.8 Morphologic features of transformants of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	73
3.8.1 Observation of colony morphometries of transformants on PDA plate	73
3.8.2 Staining with aniline blue of mycelia and morphologic observation of transformants	73
3.9 Analysis of egg parasitic ability of transformants of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	74
4 DISCUSSION	76
5 BRIEF SUMMARY	84
Chapter 3 Cloning of <i>Peacilomyces lilacinus</i> 9410 strain serine proteinase gene and its overproduction	85
1 MATERIALS	87
2 METHODS	87
3 RESULTS	95
3.1 Cloning of <i>Peacilomyces lilacinus</i> 9410 strain <i>mSP</i> gene	95
3.1.1 Cloning of cDNA of <i>mSP</i> gene	95
3.1.2 Cloning of gDNA of <i>mSP</i> gene	97
3.2 Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> -NPTL	99
3.3 Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> -NPTL- <i>mSP</i>	101
3.4 Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> -NPTL- <i>mSP</i> - <i>TtrpC</i> 102	
3.5 Construction of fungus expression vector pUPNST.....	103
3.6 Fungus expression vector pUPNST transformed into <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	103
3.7 Genetic transformation of cDNA of <i>mSP</i> gene into <i>Peacilomyces lilacinus</i> mediated by <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	104
3.8 Identification of <i>mSP</i> transformants of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	104
3.8.1 Extraction of genomic DNA of <i>mSP</i> transformants	105

3.8.2	PCR detection of <i>mSP</i> transformants	105
3.9	Southern-blot analysis of transformants	106
3.10	Genetic stability testing of resistance of transformants.....	107
3.11	Morphologic features of <i>mSP</i> transformants	107
3.11.1	Observation of colony morphometries of <i>mSP</i> transformants on PDA plate.	107
3.11.2	Staining with aniline blue of mycelia and morphologic observation of <i>mSP</i> transformants	108
3.12	Semi-quantitative RT-PCR analysis of <i>mSP</i> transformants	109
3.13	Analysis of proteinase activity of <i>mSP</i> transformants.....	110
3.14	Analysis of egg parasitic ability of <i>mSP</i> transformants of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	112
4	DISCUSSION	114
5	BRIEF SUMMARY	119
Chapter 4	Genetic transformation of <i>vgb</i> gene of <i>Vitreoscilla</i> hemoglobin into <i>Peacilomyces lilacinus</i>	120
1	MATERIALS	123
2	METHODS	123
3	RESULTS	131
3.1	Artificial design and construction of <i>vgbpl</i> gene.....	131
3.2	Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> -NPTL- <i>vgbpl</i>	132
3.3	Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> -NPTL- <i>vgbpl</i> - <i>TtrpC</i>	133
3.4	Construction of fungus expression vector pUPNVT	134
3.5	Fungus expression vector transformed into <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	135
3.6	Genetic transformation of <i>vgbpl</i> gene into <i>Peacilomyces lilacinus</i> mediated by <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	136
3.7	Identification of <i>vgbpl</i> transformants of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	136
3.7.1	Extraction of genomic DNA of <i>vgbpl</i> transformants.....	137
3.7.2	PCR detection of <i>vgbpl</i> transformants.....	137
3.8	Southern-blot analysis of <i>vgbpl</i> transformants	138
3.9	Genetic stability testing of resistance of <i>vgbpl</i> transformants.....	138
3.10	Morphologic features of <i>vgbpl</i> transformants	139
3.10.1	Observation of colony morphometries of <i>vgbpl</i> transformants on PDA plate	139

3.10.2 Staining with aniline blue of mycelia and morphologic observation of <i>vgbpl</i> transformants	140
3.11 RT-PCR analysis of mRNA expression of <i>vgbpl</i> gene of transformants	140
3.12 CO binding test to analyze expression of Vhb of transformants	141
3.13 Analysis of egg parasitic ability of <i>vgbpl</i> transformants of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	142
3.14 Activity analysis of extracellular proteinase of <i>vgbpl</i> transformants	143
3.15 Performance traits of <i>vgbpl</i> transformants of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	144
3.15.1 Performance traits of liquid culture	144
3.15.2 Spore-forming ability of solid culture	147
4 DISCUSSION	149
5 BRIEF SUMMARY	153
Chapter 5 Genetic transformation of gene of enhanced green fluorescent protein into <i>Peacilomyces lilacinus</i>	154
1 MATERIALS	158
2 METHODS	158
3 RESULTS	161
3.1 Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> -NPTL- <i>egfp</i>	161
3.2 Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1(-)- <i>PgpdA</i> -NPTL- <i>egfp</i> - <i>TtrpC</i>	163
3.3 Construction of fungus expression vector pUPNGT	163
3.4 Fungus expression vector transformed into <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	164
3.5 Genetic transformation of <i>egfp</i> gene into <i>Peacilomyces lilacinus</i> mediated by <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	165
3.6 Identification of eGFP transformants of <i>Peacilomyces lilacinus</i>	166
3.6.1 Extraction of genomic DNA of eGFP transformants	166
3.6.2 PCR detection of eGFP transformants	166
3.7 Southern-blot analysis of eGFP transformants	167
3.8 A Genetic stability testing of resistance of eGFP transformants	167
3.9 Morphologic features of eGFP transformants	168
3.9.1 Observation of colony morphometrics of eGFP transformants on PDA plate	168
3.9.2 Staining with aniline blue of mycelia and morphologic observation of eGFP transformants	168
3.10 Observation of eGFP transformants using fluorescent microscope	169

4 DISCUSSION	171
5 BRIEF SUMMARY	174
Chapter 6 Colonization of <i>npt</i> II transformants of <i>Paecilomyces lilacinus</i> on the rhizosphere of tobacco and PCR detection of <i>npt</i> II transformants from soil	175
1 MATERIALS	177
2 METHODS	177
3 RESULTS	181
3.1 Growing seedlings of tobacco	181
3.2 Preparation of fungal biocontrol agents of <i>Paecilomyces lilacinus</i>	181
3.3 Pot experiment.....	181
3.4 Colonization of wild strain and transformant NPT11 and NPT13 of <i>Paecilomyces lilacinus</i>	182
3.5 Extraction of total gDNA of mixed fungi from soil and PCR amplification of 28s rDNA of fungi.....	185
3.6 PCR detection of <i>npt</i> II transformants of <i>Paecilomyces lilacinus</i> from soil.....	187
4 DISCUSSION	190
5 BRIEF SUMMARY	192
Conclusion	193
References	196
Acknowledgment	213

根癌农杆菌介导的生防真菌淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*) 的遗传转化研究

中文摘要

淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson 1974)作为根结线虫(*Meloidogyne* spp.)、胞囊线虫(*Heteridera* spp.)等植物病原线虫的有效寄生菌,被认为是最有前途的植物病原线虫的生防真菌之一。至今,全球已有60多个国家开展了将淡紫拟青霉应用于防治植物病原线虫的研究和实践。但在淡紫拟青霉的遗传背景及其控害的作用机制等方面,目前仍了解甚少。丝状真菌遗传转化系统的建立,为人们从分子水平了解真菌的遗传背景和进一步的菌株改造提供一个强有力的工具。

本研究采用根癌农杆菌介导的遗传转化(ATMT)法建立了淡紫拟青霉(*P. lilacinus*)9410菌株的高效的遗传转化体系;在此基础上,成功实现了透明颤菌(*Vitreoscilla* sp.)血红蛋白 *vgb* 基因、来自淡紫拟青霉9410菌株的丝氨酸蛋白酶成熟肽 *mSP* 基因 cDNA 和增强型绿色荧光蛋白 *egfp* 基因对淡紫拟青霉9410菌株的遗传转化;以 *npt II* 基因为分子标记,初步建立了土壤中的转化子的PCR定性检测方法。

在中间质粒 pcDNA3.1(-)的辅助下,分别构建了 *npt II*、*mSP*、*vgbpl* 和 *egfp* 基因的遗传转化载体 pUPNT、pUPNST、pUPNVT 和 pUPNGT。以 G418 抗性基因为筛选标记,采用 ATMT 法实现了这些基因对淡紫拟青霉9410菌株的遗传转化。PCR 检测和 Southern-blot 分析证实, *npt II*、*mSP*、*vgbpl* 和 *egfp* 基因均成功整合到淡紫拟青霉9410菌株的基因组中,且所分析的转化子均是以单拷贝、随机的方式整合到基因组中的。实验结果表明,获得的 *npt II*、*mSP*、*vgbpl* 和 eGFP 转化子的遗传稳定性好、形态正常。

半定量 RT-PCR 分析证实, *mSP* 基因在 mRNA 水平获得了过量表达。*mSP* 转化子的蛋白酶活性比原始菌株显著增强;对南方根结线虫卵粒的寄生能力得到了显著提高:与原始菌株相比,转化子 *mSP8* 和 *mSP16* 的孢子悬液处理组的相对寄生率提高了 15.04~18.62%,菌丝处理组的相对寄生率提高了 14.92~16.87%。RT-PCR 分析证实,转化子的 *vgbpl* 基因在 mRNA 水平得到表达。CO 结合试验证实, *vgb* 基因已成功在转化子 *vgb15* 和 17 中表达出有生物活性的 VHb 蛋白。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库