

## PEG 介导的苹果腐烂病菌原生质体转化

高静, 李艳波, 柯希望, 康振生, 黄丽丽\*

旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 西北农林科技大学植物保护学院, 杨凌 712100

**摘要:**【目的】建立 PEG 介导的苹果腐烂病菌原生质体遗传转化体系。【方法】本文利用带有 *hph* 基因的质粒, 以苹果腐烂病菌 (*Valsa mali* var. *mali*) 03-8 为受体菌株, 通过 PEG 融合法对其原生体进行转化。【结果】于 YEPD 内培养 48 h 的菌丝, 在酶解液浓度为 50 mg/mL Driselase + 10 mg/mL Lysing Enzymes 情况下, 按 10 mL 酶液/0.5 g 湿菌体比例, 酶解 2 h 时可以释放出  $4 \times 10^7$  个/mL 原生质体, 其转化效率为 44 个/ $\mu$ g DNA。对转化子的 PCR 检测和 Southern 杂交分析表明, *hph* 基因已经整合进苹果树腐烂病菌的基因组中。转化子在 PDA 培养基中継代 5 次后, 87.5% 的转化子仍能正常生长, 表明外源基因 *hph* 能在苹果树腐烂病菌中稳定遗传。【结论】该转化体系的建立为苹果树腐烂病菌致病相关基因的深入研究奠定了基础。

**关键词:** 原生质体, 转化子, *hph* 基因, 转化效率, 稳定性

**中图分类号:** Q933      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 09-1194-06

苹果树腐烂病是由苹果黑腐皮壳属真菌 [*Valsa mali* = *V. ceratosperra* (Tode; Fr.) Maire., 无性型为 *Cytospora sacculus* (Schwein.) Gvrit.] 引起的一种树干皮层严重腐烂的病害, 病害轻时造成树势衰弱、苹果产量和品质下降, 严重时造成树死园毁, 损失惨重。其主要发生地为中国<sup>[1-2]</sup>、日本<sup>[3]</sup>以及韩国<sup>[4-5]</sup>。在我国, 部分苹果产区病园率高达 100%, 病株率高达 90%<sup>[2]</sup>。苹果腐烂病的发生危害日趋严重, 目前已经成为严重制约我国苹果产业发展的最主要因素。

由于腐烂病菌具有潜伏侵染特性<sup>[6]</sup>, 且一旦进入树皮的韧皮部和木质部<sup>[7]</sup>, 化学药剂则很难渗透进入树皮而达到有效控制其扩展的目的, 因而生产上只能采取后期被动的治疗措施即发病后刮除病斑来减少病菌的进一步扩展, 但其防治效果很差且费工费时<sup>[3]</sup>。因此, 只有了解病菌致病基因的相关功

能及其致病机制, 才能对有效控制该病害的方法进行进一步的研究和探索。而转化是获得所需筛选基因的一种简单方法<sup>[8]</sup>。近年来, 随着分子生物学向植物病理学的渗透和发展, 真菌的遗传转化也越来越受到重视。目前至少已有 100 多种丝状真菌实现了遗传转化<sup>[9]</sup>。PEG 介导的遗传转化是使用较早较普遍的细胞融合方法, 该方法是 Kao 等<sup>[10]</sup>建立的, 此后 PEG 介导的原生质体转化法逐渐延伸列粗糙脉孢菌构巢曲霉<sup>[11]</sup>、红曲霉菌等丝状真菌<sup>[12]</sup>, 使这一方法在真菌转化中逐渐被广泛应用。PEG 介导的原生质体的转化能够准确敲除所需目的基因从而研究其基因功能。利用该方法在稻瘟菌、禾谷镰孢菌等病原真菌中进行与信号转导、生长发育、致病等相关基因敲除突变体的研究广为报道, 并且取得的重要进展<sup>[13-15]</sup>。

因此, 本研究拟建立 PEG 介导的苹果腐烂病菌

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30771396); 高等学校学科创新引智计划资助项目 (B07049)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-29-87091312; E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn

**作者简介:** 高静 (1986-), 女, 甘肃金昌人, 硕士研究生, 主要从事病害综合防治的学习与研究。E-mail: gaojingshai@yahoo.cn

**收稿日期:** 2011-03-08; **修回日期:** 2011-05-10

的转化体系,为该病菌的致病机制研究、致病相关基因克隆以及为寻求控制该病害的有效途径奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**以苹果腐烂病菌 *Valsa mali* var. *mali* 03-8 菌株作为转化受体,由西北农林科技大学植物保护学院植物病害综合治理实验室提供,按常规方法保存在 PDA 上。二元载体 pBIG2RHPH2-GFP-GUS 作为转化供体,含 Kanamycin 抗性基因、Hygromycin B 抗性基因、GUS-GFP 融合基因,由浙江大学宋凤鸣教授惠赠。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**Taq DNA 聚合酶购自 Fermentas、EcoRI 限制性内切酶购自 TaKaRa、Driselase、Lysing Enzymes 购自 Sigma、潮霉素购自 Roche、PEG8000 购自 Amresco、氨基青霉素、DNA 凝胶回收试剂盒、dNTPs 购自 Wolsen、探针标记试剂盒购自 Promega,其它试剂均为国产分析纯。PTC-200 型 PCR 仪购自 MJ. Research. Inc, Centrifuge 5180R 型台式低温冷冻离心机购自 Eppendorf, Gene Genius 型凝胶成像系统购自 SYNGENE, HB-1000 型杂交炉购自 UVP, DYY-12 型电泳仪和 DYY-III 33A 型电泳槽购自北京六一厂, HH·SY21-Ni4C 型电热恒温水浴锅和 HZQ-F160 型全温震荡培养箱购自哈东联电子技术开发有限公司。

### 1.2 苹果腐烂病菌分生孢子的培养

具体方法参照臧睿的文章<sup>[16]</sup>。将 *Valsa mali* var. *mali* 强致病菌株 03-8 接种于 PDA 培养基上活化培养 3 d, 转接于 20% ABA 平板上, 25℃ 下光照培养 15 d 左右获得大量分生孢子角, 用无菌水收集分生孢子, 备用。

### 1.3 苹果腐烂病菌原生质体的制备

**1.3.1 培养基:**① Bottom 培养基、Top 培养基、液态 YEPD、TB<sub>3</sub> 培养基、PTC 和 STC 参照王光辉的文章<sup>[17]</sup>② PDA: 按常规方法配制。

**1.3.2 酶解液的配制:**酶解液配方: 500 mg Driselase + 100 mg Lysing Enzymes 溶解至 10 mL 1.2 mol/L KCl 溶液内。

**1.3.3 苹果腐烂病菌原生质体的制备:**苹果腐烂病菌原生质体的制备方法参照 Yelton<sup>[18]</sup>, 略有改动。挑取苹果树腐烂病菌分生孢子角以无菌水制成分生

孢子悬浮液, 加入 100 mL 液态 YEPD, 摇瓶内 25℃、150 r/min 培养 2 d。1.2 mol/L 的 KCl 为原生质体释放稳渗剂, 按 10 mL 酶液/0.5 g 湿菌体比例, 30℃、90 r/min 酶解 2 h, 实验重复 3 次。

### 1.4 苹果腐烂病菌的遗传转化与再生

苹果腐烂病菌原生质体的转化方法参照 Proctor<sup>[19]</sup>, 略有改动。将得到的原生质体稀释至  $2 \times 10^7$  个/mL。将二元载体 pBIG2RHPH2-GFP-GUS (5 g) 加入到含有 200 L 原生质体的 50 mL 离心管中混合均匀, 室温下静置 20 min。加入 1 mL 40% PTC 到管中, 翻转混合均匀, 室温静置 20 min。加入 5 mL TB<sub>3</sub> (含 50 g/mL 氨基青霉素), 室温摇过夜。将摇过夜的原生质体  $4000 \times g$  离心 6 min, 弃去上清液, 剩余大约 1 mL 的残液将剩余物悬浮。将复生的原生质体与 10 mL 热融并冷却至 45℃ 的 bottom 培养基混合, 待凝固后封口, 在 25℃ 倒置培养 1 d。在 bottom 培养基上再铺 10 mL 的 top (含 50 g/mL hyg) 培养基, 待凝固后封口, 25℃ 倒置培养 5 d, 能再生的原生质体视为初筛拟转化子。

### 1.5 苹果腐烂病菌转化子的筛选

苹果腐烂病菌原生质体转化后在筛选培养基上长出的菌落为初筛到的拟转化子, 分别从初筛平板上挑取单菌落转接于含 100 μg/mL 潮霉素的 PDA 平板上继续筛选转化子, 能在该平板上继续生长的转化子视为拟转化子, 进一步做鉴定。

### 1.6 苹果腐烂病菌转化子的鉴定

**1.6.1 PCR 鉴定:**挑取在含 50 μg/mL 潮霉素的 PDA 平板上生长的拟转化子单菌落和对照菌株 03-8 于铺有玻璃纸的 PDA 平板上培养收集菌丝, 用 CTAB 法<sup>[20]</sup>提取拟转化子与对照菌株基因组 DNA。PCR 引物及反应条件参照朱琳的文章<sup>[21]</sup>。

**1.6.2 Southern blotting 检测:**酶切和 Southern 杂交参照 Sambrook 等<sup>[22]</sup>的方法, 略有修改。完全酶解的 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后转移到尼龙膜上进行杂交, 杂交所用探针为 <sup>32</sup>P 标记的潮霉素磷酸转移酶基因片段 (811 bp)。

### 1.7 转化子的遗传稳定性检测

挑取 Southern 杂交检测插入的苹果腐烂病菌转化子单菌落于含潮霉素的 PDA 平板上, 待长出后, 再转接至不含潮霉素的 PDA 培养基上。在含与不含潮霉素的 PDA 培养基上交替培养 5 代后, 观察转化子是否仍对潮霉素表现出抗性, 实验重复 3 次。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌丝菌龄对苹果腐烂病菌原生质转化的影响

研究表明,培养48 h的苹果腐烂病菌分生孢子可以萌发产生足够量的菌丝用于原生质体的制备。培养时间小于48 h,由于收集到的菌丝量不足而导致原生质体获得量少;培养时间超过48 h,菌丝菌龄较老,酶解时间较长,容易引起部分原生质体死亡。

### 2.2 苹果腐烂病菌转化子的筛选

从 pBIG2RHPH2-GFP-GUS 的初筛平板上挑取单菌落转接于含100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素的平板上(图略)。结果表明,在质粒 DNA 的量为5  $\mu\text{g}$ 时,总共获得218个转化子,其转化效率达到44个/ $\mu\text{g}$  DNA。其中有些转化子刚接到平板上时略有生长,但生长速度很慢,过5 d后就不再生长了。初步分析可能是 *hyh* 基因插入宿主菌基因组中的位点不同,引起了基因的表达量不同,表达量低时,转化子不能分解潮霉素从而使其生长受到抑制。

### 2.3 苹果腐烂病菌转化子的 PCR 鉴定

挑取在含50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素上生长良好的菌落,分别提取基因组 DNA 后进行 *hph* 基因扩增(图略)。在扩增的拟转化子中,有194个转化子可以扩增出大小为1000 bp潮霉素抗性基因的特异性片段,说明质粒 pBIG2RHPH2-GFP-GUS 可能成功插入突变株中,其转化率达到88.9%。而野生菌没有扩增出潮霉素磷酸转移酶基因的谱带,说明在野生菌中不存在潮霉素磷酸转移酶基因的序列,没有质粒的整合。

### 2.4 转化子的 Southern blotting 分析

以潮霉素磷酸转移酶基因片段(811 bp)为探针,对所获得218个转化子中的12个转化子进行 Southern blotting 检测分析,发现12个转化子中有8个转化子均出现了杂交信号(图1,未全附),其中阳性对照与 *hph* 探针杂交显出5400 bp大小的特异性条带,泳道1、2、4、7的转化子也能与 *hph* 探针杂交显出特异条带,而阴性对照与 *hph* 探针杂交未能显出特异条带,由此可以确定质粒 pBIG2RHPH2-GFP-GUS 已成功插入突变株中。表明通过 PEG 介导的原生质体遗传转化法已经实现了对苹果腐烂病菌的转化。

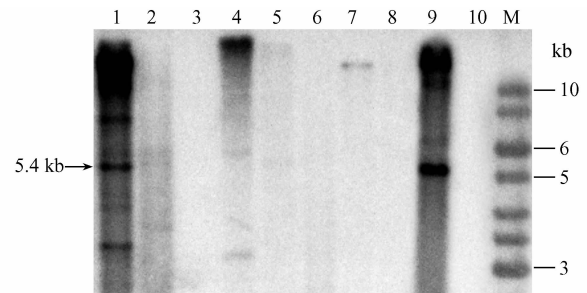


图1 苹果腐烂病菌转化子 Southern 分析图

Fig.1 Southern hybridisation analysis of PEG-mediated *Valsa mali* var. *mali* Transformants. Lane 1-Lane8: *EcoR* I digested genomic DNA of transformants; lane 9: positive control; lane 10: *EcoR* I digested genomic DNA of Wild-type 03-8; M: 10 kb DNA molecular size marker.

### 2.5 苹果腐烂病菌转化子的遗传稳定性分析

对经过 Southern 检测后有信号的8个转化子进行遗传稳定性分析,实验结果表明,经过在含潮霉素与不含潮霉素的 PDA 培养基上连续5代转接之后(图2),有7个转化子可以稳定遗传,即87.5%的转化子在5代之后仍能表现出对潮霉素的抗性。

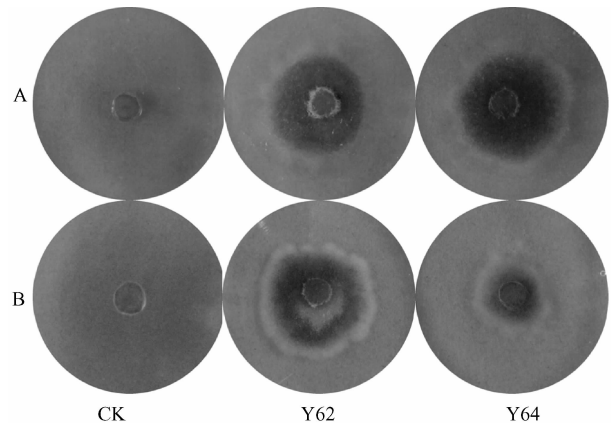


图2 转化子遗传稳定性图

Fig.2 Mitotic stability of transformants. A: F1; B: F5; CK: wild type 03-8; Y64 and Y62: transformants.

## 3 讨论

关于苹果树腐烂病菌,科学家们已经对病菌的种类<sup>[23]</sup>、生物学特性<sup>[24-25]</sup>、致病性分化<sup>[26]</sup>等方面进行了系统深入的研究,而对于其致病机制方面的研究尚未见报道,我们建立的 PEG 介导的苹果腐烂病菌的遗传转化体系,可为其致病基因的研究提供技术支撑,进而为揭示其致病机制奠定基础。PEG

介导的真菌的原生质体转化方法是丝状真菌遗传转化方法中最原始的方法<sup>[27]</sup>, 有很多真菌已利用 PEG 介导的原生质体转化方法成功实现了转化。我们的这一转化系统不但成功实现了对苹果腐烂病菌的转化, 而且转化效率较高, 达到 44 个/ $\mu\text{g}$  DNA。目前我们已经构建了含有 218 个转化了的转化子库, 还正在扩建转化子库以便获得致病突变体, 同时为深入研究苹果腐烂病菌致病及发育相关基因功能提供了一定的技术保障。

我们发现菌丝菌龄、酶解液浓度、酶解时间等因素对转化效率都具有显著的影响。菌体能否产生大量、活性高的原生质体与菌体本身的生理状态有一定的关系, 而酶的作用也会受到菌龄的影响, 菌龄过长, 菌体的细胞壁老化增厚, 酶解难度增加, 很难释放出原生质体; 培养时间太短, 菌体由于细胞壁薄虽然更容易释放原生质体, 但是原生质体容易破裂, 而且不容易再生。要想成功实现对腐烂病菌的转化, 就需要腐烂病菌的菌丝菌龄及酶解液浓度及酶解时间都达到一定的数值。通过三者之间的相互协同作用, 才能制备出数量可观且活性较高的原生质体。

渗透压稳定剂的种类和浓度也是原生质体的形成和再生的关键因素。当刚刚形成的原生质体被释放到酶液中时, 渗透压稳定剂和裂解酶会对其同时产生保护和伤害作用<sup>[28]</sup>。因此, 稳定剂种类的选择至关重要, 渗透压稳定剂主要是应用无机盐类(如 NaCl、KCl、MgCl)和常见的有机物(如蔗糖、甘露醇、山梨醇)。丝状真菌原生质体的制备通常选择无机盐作为渗透压稳定剂, 因此, 本研究选用 KCl 作为稳渗剂, 但是在浓度为 0.8 mol/L 时无法产生原生质体, 后来, 分别筛选了 0.2 mol/L、0.4 mol/L、0.8 mol/L、1.2 mol/L、1.6 mol/L 的 KCl, 结果发现以 1.2 mol/L 的 KCl 作为稳渗剂效果最好。

Fitzgerald<sup>[29]</sup>以 PEG 介导的 *Venturia inaequalis* 的原生质体的转化实验中, 所得到的转化子中有 98% 的转化子不能维持对潮霉素的抗性。但是 Sonia 利用 PEG 融合法对 *Monascus purpureus* 转化成功后, 有 60% 的转化子在有丝分裂中保持稳定<sup>[30]</sup>。而本研究在以 PEG 介导的 *Valsa mali* var. *mali* 的转化实验中, 有 87.5% 的转化子都可以稳定遗传。初步分析导致这种现象的原因主要有三种, 可能是质粒 DNA 整合进病菌基因组中一个不稳定的区域; 也

可能是先前质粒 DNA 插入了, 之后随着继代筛选的压力被病菌细胞内的一些酶降解了; 也可能是对各种菌转化有一定的差异, 转化过程会由于原生质体的凝聚融合易形成多核体导致在继代培养中丢失外源 DNA<sup>[31]</sup>。

综上所述, 本研究通过 PEG 介导的苹果腐烂病菌原生质体的转化, 首次建立了苹果腐烂病菌的遗传转化体系, 从而为进行腐烂病菌致病相关基因的进一步研究提供了一定的技术支撑。

## 参考文献

- [1] 陈策, 李美娜, 史秀琴, 王金有. 苹果树腐烂病 (*Valsa mali* Miyabe et Yamada) 侵染时期研究. 植物病理学报 (*Chinese Journal of Plant Pathology*), 1987, 17 (2): 3-6.
- [2] 王磊, 臧睿, 黄丽丽, 谢芳琴, 高小宁. 陕西关中地区苹果树腐烂病调查初报. 西北农林科技大学学报 (自然科学版) [*Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*], 2005, 33(增刊): 98-100.
- [3] Abe K, Kotoda N, Kato H, Soejima J. Resistance sources to *Valsa* canker (*Valsa ceratosperma*) in a germplasm collection of diverse *Malus* species. *Plant Breeding*, 2007, 126(4): 449-453.
- [4] Uhm JY, Sohn HR. Control of apple *Valsa* canker by localized spraying with neosozin solution, an arsenic fungicide. *Korean Journal of Plant Pathology*, 1995, 11 (1): 9-16.
- [5] Lee DH, Lee SW, Choi KH, Kim DA, Uhm JY. Survey on the occurrence of apple disease in Korea from 1992 to 2000. *The plant pathology Journal*, 2006, 22(4): 375-380.
- [6] 刘福昌, 陈策, 史秀琴, 郭进贵, 邢祖芳, 张学炜. 苹果树腐烂病菌 (*Valsa mali* (Miyabe. Et) Yamda) 潜伏侵染研究. 植物保护学报 (*Acta Phytophylacica Sinica*), 1979, 6(3): 1-8.
- [7] 田村 修, 齐藤 泉. リンゴ腐らん病病斑組織の季節的变化に関する解剖学的観察. 日植病報, 1982, 48 (4): 490-498.
- [8] 杨迎青, 杨媚, 李明海, 李勇, 贺晓霞, 周而勋. 根癌农杆菌介导的水稻纹枯病菌转化系统的建立. 中国水稻科学 (*Chinese Journal of Rice Science*), 2010, 24 (6): 617-622.
- [9] 王政逸, 李德葆. 限制酶介导的遗传转化及其在丝状真菌中的应用. 菌物系统 (*Mycosystema*), 2001, 20 (1): 142-147.

- [10] Kao KN, Michayluk MR. A Method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, 1974, 115: 355-367.
- [11] Ballance DJ, Buxton FP, Turner G. Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5-(p) decarboxylase gene of *Neurospora Crassa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1983, 112(1): 284-289.
- [12] 周礼红, 李国琴, 王正祥, 诸葛健. 红曲霉原生质体的制备、再生及其遗传转化系统. *遗传 (Hereditas)*, 2005, 27(3): 423-428.
- [13] Li L, Xue C, Bruno K, Nishimura M, Xu J R. Two PAK kinase genes, *CHM1* and *MST20*, have distinct functions in *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(5): 547-556.
- [14] Bluhm BH, Zhao X, Flaherty JE, Xu JR, Dunkle LD. *RAS2* regulates growth and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(6): 627-636.
- [15] Ding S, Mehrabi R, Koten C, Kang Z, Wei Y, Seong K, Kistler H C, Xu J R. The transducin beta like gene *FTL1* is essential for pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Eucaryotic Cell*, 2008, 8(6): 867-876.
- [16] 臧睿. 陕西苹果树腐烂病菌不同分离株生物学特性及致病性研究, 西北农林科技大学, 硕士学位论文, 2006.
- [17] 王光辉. 禾谷镰刀菌 *AMT1* 基因的功能研究, 西北农林科技大学, 硕士学位论文, 2010.
- [18] Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *National Academy Sciences*, 1984, 81(5): 1470-1474.
- [19] Proctor RH, Hohn TM, McCormick SP. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of atrichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1995, 8(4): 593-601.
- [20] Stewart CN Jr, Laura EV. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Bio Techniques*, 1993, 14(5): 748-751.
- [21] 朱琳. 根癌农杆菌介导的小麦全蚀菌的遗传转化, 西北农林科技大学, 硕士学位论文, 2010.
- [22] Fritsch EF, Joseph Sambrook, Tom Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 5. 28-5. 32, 9. 31-9. 58.
- [23] Wang XL, Wei JL, Huang LL, Kang ZS. Re-evaluation of pathogens causing Valsa canker on apple in China. *Mycologia*, 2010; 10. 3852/09-165.
- [24] 臧睿, 黄丽丽, 康振生, 王旭丽. 陕西苹果树腐烂病菌 (*Cytospora spp.*) 不同分离株的生物学特性与致病性研究. *植物病理学报 (Chinese Journal of Plant Pathology)*, 2007, 37(4): 343-351.
- [25] 原田幸雄. 培养基上苹果树腐烂病菌分生孢子器的形成. *植物病理学文摘 (Review of Plant Pathology)*, 1979, (1): 45.
- [26] 韦洁玲, 黄丽丽, 郜佐鹏, 柯希望, 康振生. 苹果树腐烂病室内快速评价方法的研究. *植物病理学报 (Chinese Journal of Plant Pathology)*, 2010, 40(1): 14-20.
- [27] Riach MBR, Kinghorn JR. *Fungal Genetics: principles and practice*. 1. New York: CRC, 1996: 209-233.
- [28] Jeanmougin F, ThomPson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*, 1998, 23(10): 403-405.
- [29] Fitzgerald AM, Mudge AM, Gleave AP, Plummer KM. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. *Mycological Research*, 2003, 107(7): 803-810.
- [30] Campoy S, Pérez F, Martín JF, Gutiérrez S, Liras P. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Current Genetics*, 2003, 43(6): 447-452.
- [31] 刘士旺. 生防绿色木霉工程菌的构建及其诱导植物抗病性研究, 浙江大学, 博士学位论文, 2003.

## Development of Genetic Transformation system of *Valsa mali* of apple mediated by PEG

Jing Gao, Yanbo Li, Xiwang Ke, Zhensheng Kang, Lili Huang\*

National Key Laboratory of Crops Stress Biology for Dryland and College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

**Abstract:** [Objective] The genetic transformation of *Valsa mali* var. *mali* was developed by PEG-mediated protoplasts transformation. [Method] It was transformed by PEG-induced fusion of protoplasts. The plasmid pBIG2RHPH2-GFP-GUS carrying *hph* gene was used and *Valsa mali* var. *mali* 03-8 isolate was used as the host strain. [Result] At 50 mg/mL driselase + 10 mg/mL lysing enzymes concentration, the mycelium of *Valsa mali* var. *mali* cultured in YEPD medium for 48 h was hydrolyzed in 10 mL enzymes liquid /0.5 g wet mycelium for 2 h. The protoplast yield was  $4 \times 10^7$  CFU/mg. The transformation efficiency was 44 per g DNA. Analysis of the transformants by PCR and Southern blotting showed that the selectable marker gene *hph* was integrated effectively into the genome of *Valsa mali* var. *mali*. After 5 subculturing on PDA, 87.5% transformants could grow. This stability test of transformants suggested that the foreign gene *hph* was stable in heredity. [Conclusion] This transformation system is a valuable and important tool for the further study of the pathogenic gene of *Valsa mali*.

**Keywords:** protoplast, transformant, *hph* gene, transformation efficiency, stability test

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771396)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-29-87091312; E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn

Received: 8 March 2011/Revised: 10 May 2011

### 《微生物学报》编委赵立平教授 在第111届美国微生物学会年会上做大会报告

美国新奥尔良当地时间2011年5月21日下午,中国微生物学会理事、《微生物学报》编委、中国微生物学会环境微生物学专业委员会副主任委员、上海交通大学生命科学技术学院赵立平教授在第111届美国微生物学会年会开幕式上做大会报告。赵教授向大会介绍了他们实验室用人体系统生物学方法监测和评估人体健康,以及用中医药食同源食品调节肠道菌群预防代谢综合征的研究进展,得到与会者的好评。

美国微生物学会有将近5万名会员,是全球最大的微生物学家的学术组织。每年5月召开一届年会,至今已举办111届。每届年会有超过1万2千人参加,开幕式大会报告是最重要的学术报告,参加听讲的人数超过5千人。

今年的开幕式大会报告有3位演讲人,另外两位分别是麻省理工教授、2010年美国总统科学奖获得者 Susan Lindquist 和德国马普海洋微生物学研究所教授 Nicole Dubilier。