

# 以潮霉素 B 抗性为选择标记的深黄被孢霉原生质体转化 Protoplast Transformation of *Mortierella isabellina* with Hygromycin B Resistance Plasmid PD4

张学炜,王笑梅,李明春,魏东盛,陈 雪,邢来君\*

ZHANG Xue-Wei, WANG Xiao-Mei, LI Ming-Chun, WEI Dong-Sheng, CHEN Xue and XING Lai-Jun\*

天津市功能基因组学重点实验室,南开大学生命科学学院微生物学系,天津 300071

Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

**摘 要** 利用亚硝基胍(MNNG)诱变方法筛选了一株深黄被孢霉潮霉素 B 敏感型菌株 M6-22-4。采用 PEG 介导的方法,将含有 *E. coli* 潮霉素 B 抗性标记的 PD4 质粒转入敏感株 M6-22-4 原生质体,并在潮霉素 B 浓度为 400 μg/mL 的选择培养基上筛选转化子,获得了 1.6~2.8 个转化子/μg 质粒 DNA 的转化频率。稳定性实验表明,质粒线性化后所获得的转化子在 PDA 培养基上传代 10 代以后,转接到选择平板上有 31.6% 仍具有 HmB 抗性。随机挑选了 3 个转化子,通过 PCR 方法检测到潮霉素抗性基因的存在。Southern 杂交发现,潮霉素抗性基因已经以 1~2 拷贝数整合到深黄被孢霉 M6-22-4 染色体上,这是深黄被孢霉转化系统的首次报道。

**关键词** 深黄被孢霉,潮霉素抗性,原生质体,转化

中图分类号 Q933 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)03-0462-05

**Abstract** A strain *Mortierella isabellina* M6-22-4, which was sensitive to hygromycin B, was selected by treating parental spores with N-methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). Protoplasts of the strain *Mortierella isabellina* M6-22-4 were transformed successfully to hygromycin B resistance using the PD4 plasmid, which contains the *Escherichia coli hph* gene under the control of *Mortierella alpina his* H4.1 promoter. The PD4 plasmid was introduced by PEG/CaCl<sub>2</sub> treatment. Transformation frequencies of 1.6~2.8 transformants/μg of DNA were achieved. Then they were successively incubated to non-selected PDA plates for 10 generations. About 31.6% transformants only from digested plasmid were mitotically stable and showed different hygromycin B resistance when they were incubated back to selection plates. The results of PCR and Southern analysis in three transformants indicated that the plasmid PD4 had been integrated into the fungal genome with 1~2 copies. This is the first report of *Mortierella isabellina* transformation system and supplies an important tool for further research into genetic manipulation of this filamentous fungus.

**Key words** *Mortierella isabellina*, hygromycin resistance, protoplast, transformation

近年的研究实践表明,通过基因敲除或诱变技术筛选一系列真菌脂肪酸脱氢酶缺失突变株是有目的研究真菌脂肪酸代谢调控并生产生物重要活性物质的一条有效途径<sup>[1-4]</sup>,而 DNA 介导的真菌转化,

是筛选真菌基因缺失突变株的常用技术之一。其关键技术一是选择一种有利于转化子筛选的遗传标记和携带有该选择标记的转化载体;二是通过实验找到一种旨在提高转化效率的转化方法和条件。目

Received: November 9, 2006; Accepted: December 20, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30200176) and the Natural Science Foundation of Tianjin (No. 013802511).

\* Corresponding author. Tel: +86-22-23508506; Fax: +86-22-23508800; E-mail: xinglaijun@eyou.com

国家自然科学基金(No. 30200176)和天津市自然科学基金(No. 013802511)资助。天津科技大学微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

前,可用于丝状真菌转化筛选的遗传标记主要有三类:抗生素抗性标记、营养缺陷型标记以及具有一定显色反应的报告基因。由于多数真菌营养缺陷型标记难以获得而报告基因的检测较为麻烦,相比之下抗生素抗性标记较易获得且检测简单,因此抗生素抗性标记更具有优势。而在诸多抗生素抗性标记中,又以潮霉素 B 抗性(Hygromycin B, HmB)最为常用<sup>[5]</sup>。近年来根据 *E. coli* 潮霉素抗性基因(*hph*),人们已经构建了针对 *E. coli*<sup>[6,7]</sup>、酿酒酵母(*S. cerevisiae*)<sup>[6,8]</sup>、丝状真菌<sup>[9-12]</sup>、植物细胞<sup>[13-14]</sup>和动物细胞<sup>[15]</sup>转化 HmB 抗性的载体。

深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)是生产  $\gamma$ -亚麻酸( $\gamma$ -Linolenic, GLA)最具希望的真菌之一<sup>[16]</sup>,由于目前有关深黄被孢霉不饱和脂肪酸脱氢酶的遗传背景还不十分清楚,尚未见到该菌成功转化的报道。本文为了探讨该菌转化 HmB 的可能性和转化条件,以亚硝基胍诱变方法筛选到一株对药物 HmB 敏感的深黄被孢霉 M6-22-4 菌株。以该菌株为受体菌,用含有 *E. coli* HmB 抗性基因的 PD4 质粒,采用原生质体-PEG/CaCl<sub>2</sub> 融合方法进行了转化实验,在含有 HmB 的平板上对转化子筛选并进行了相关的遗传鉴定,目的是为该菌  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因缺失突变株的筛选提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和培养基

深黄被孢霉 M6-22,本实验出发菌株,由本研究室保存;HmB 敏感型菌株 M6-22-4,本研究筛选,用作转化实验的受体菌。*E. coli* DH5 $\alpha$  用于载体分子的扩增。GY 培养基、查氏培养基和 PDA 固体培养基,用于深黄被孢霉 HmB 敏感菌株的筛选;PDA 培养基还用于菌种保存;液体 PDA 培养基、低渗再生培养基(含 0.5% 酵母粉的查氏培养基)和高渗再生培养基(含 1.2mol/L 山梨醇和 0.5% 酵母粉的查氏培养基),用于深黄被孢霉受体菌原生质体制备和再生,选择培养基(含 400 $\mu$ g/mL 潮霉素的高渗再生培养基)用于 PD4 转化子的筛选。

### 1.2 质粒

用于转化的质粒 PD4(约 6.4kb)由英国 Donald A. MacKenzie 教授(The Institute of Food Research, Norwich, UK.)赠送,该质粒是为高山被孢霉(*Mortierella alpina*)转化而开发,由质粒 pAN7-1 构建而成,其上含有略经修改的 HmB 抗性基因(*hpt*)和氨基青霉素抗性基因(*bla*)。在 *hpt* 基因上游有 *M. alpina* his H4.1 启动子(约 1kb)与之相连以促其表

达,下游是曲霉 *trpC* 基因的转录终止区序列(约 700bp)以及一个来自 *M. alpina* 的 18S rDNA 片段<sup>[9]</sup>。

### 1.3 主要试剂

甲基硝基亚硝基胍(MNNG),德国 FluKa 产品,购自北京化学试剂公司;溶壁酶由广东微生物研究所生产;限制性内切酶、PCR 所用试剂、植物基因组 DNA 提取试剂盒购自大连宝生物公司,PCR 引物由三博公司合成。

### 1.4 深黄被孢霉潮霉素 B 抗性敏感型受体菌的筛选

由于深黄被孢霉遗传转化为初次尝试,本实验室没有可用于深黄被孢霉遗传转化的营养缺陷型菌株,而且其选择比较费时费力。根据已有的报道和 Donald 教授赠送的 PD4 质粒的特性,实验选择了 HmB 抗性作为选择标记进行该菌遗传转化的初步尝试。但用 HmB 抗性作选择标记,其先决条件是受体菌株对 HmB 药物应具有敏感性。经实验,深黄被孢霉 M6-22 菌株对 HmB 不敏感。在普通营养平板上,即使在含有 1000  $\mu$ gHmB/mL 以上也不能完全阻止其生长,因此,必须首先筛选一株对 HmB 敏感的受体菌株。我们首先通过分组实验,利用不同剂量(0.1、0.2、0.5 和 1.0mg/mL)的甲基硝基亚硝基胍(MNNG)分别对梯度稀释( $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$  和  $1 \times 10^3$  个/mL)的 M6-22 孢子进行诱变处理,诱变时间分别为 10、20、30 和 40min,随之接种到 GY 固体平板于 30 $^{\circ}$ C 静置培养,从致死率达 95% 以上的组别中收获经诱变的单菌株,分别接种到 GY 斜面试管中保存备选。接着分别制备一系列含有不同水平 HmB(50、100、200、400、600、800、1000 $\mu$ g/mL)的不同培养基(PDA 培养基、GY 培养基、含 0.5% 酵母粉的查氏培养基)划线分成 16 个小格,每格放一经过消毒的微型圆滤纸片,分别将上述经诱变的单菌株点接于滤纸片上 30 $^{\circ}$ C 静置培养,并观察生长情况。以此选择对 HmB 敏感的菌株、培养基和最低抗性剂量。

### 1.5 受体菌原生质体制备

参照李明春<sup>[17]</sup>等介绍的方法,略作改进进行。

### 1.6 载体转化

转化缓冲液:STC:1.0mol/L 山梨醇,10mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),10mmol/L CaCl<sub>2</sub>。PEG4000 溶液:50% PEG4000,10mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),50mmol/L CaCl<sub>2</sub>。PEG6000 溶液:50% PEG6000,10mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),50mmol/L CaCl<sub>2</sub>。PEG8000 溶液:50% PEG8000,10mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),50mmol/L CaCl<sub>2</sub>。

法。取上述已纯化的原生质体  $100\mu\text{L}$  (浓度为  $10^8$  个/mL), 加入  $5\mu\text{L}$  PD4 质粒(含  $10\mu\text{g}$  DNA), 混匀后冰浴 20~30min, 然后加入  $1.25\text{mL}$  PEG 溶液, 室温静置 10min; 再分别加入  $1\text{mL}$ ,  $1\text{mL}$ ,  $2\text{mL}$  STC 溶液稀释  $4^\circ\text{C}$ 、 $3000\text{r}/\text{min}$  离心 30min; 弃上清, 将沉淀的原生质体悬浮于  $400\mu\text{L}$  高渗再生液体培养基中。 $30^\circ\text{C}$  摇床培养 12~16h 后, 涂布于选择培养基平板上,  $30^\circ\text{C}$  静置培养 5~7d, 筛选转化子。

### 1.7 转化子基因组 DNA 的提取

转化子基因组 DNA 的提取按照宝生物植物基因组提取试剂盒说明进行。

### 1.8 PCR 鉴定

根据 PD4 质粒上 HmB 抗性基因(*hpt*) 5'和 3'端序列设计一对特异引物, 上游引物(*hph1*) 5'-A TGCCTGAACCTACCGCGAC-3', 下游引物(*hph2*) 5'-CTA TTC TTGCCCCTCGGAC-3'。以 PCR 方法对选择培养基上生长的阳性转化子进行检测。反应条件为  $94^\circ\text{C}$  5min,  $94^\circ\text{C}$  1min,  $55^\circ\text{C}$  1min,  $72^\circ\text{C}$  1min, 30 个循环,  $72^\circ\text{C}$  10min。

### 1.9 Southern 分析

以 *hph1* 和 *hph2* 分别为上下游引物, 以 PD4 质粒为模板扩增 HmB 抗性基因(*hph*) 序列(约 1043 bp) 并以此为探针按照萨姆·布鲁克的分子克隆同位素标记方法用  $^{32}\text{P}$  放射性同位素进行标记, 按 Southern 杂交说明对转化子进行检测。

### 1.10 转化子有丝分裂稳定性检验

将筛选得到的阳性转化子, 接到 PDA 斜面培养基上, 连续传代 10 代以后, 转接至潮霉素选择培养基中培养, 观察转化子的稳定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 深黄被孢霉 HmB 抗性敏感菌株的筛选

利用上述方法, 结果筛选出一株菌株在含有

$400\mu\text{g}$  HmB/mL(或以上), 含有 0.5% 酵母粉的查氏培养基平板上不能生长。随后经过多次传代培养, 观察到该菌株对这一水平的 HmB 敏感性基本稳定。同时, 对筛选出的这株菌提取总脂肪酸, 利用气相色谱对各脂肪酸组成进行了分析, 其测试结果无论是脂肪酸组成、保留时间以及各脂肪酸占总脂肪酸比例均和出发菌株深黄被孢霉 M6-22 一致。遂将该菌株定名为 M6-22-4, 选作载体转化的受体菌, 同时把含 0.5% 酵母粉的查氏培养基作为选择培养基, HmB 含量为  $400\mu\text{g}/\text{mL}$  作为抗性筛选剂量, 用于本实验的转化和筛选。

### 2.2 受体菌原生质体制备

实验参照李明春等报道<sup>[7]</sup>, 按照以下优化条件进行。分别称取溶壁酶(2%)、蜗牛酶(4%)共溶于  $5\text{mL}$   $0.8\text{mol}/\text{L}$   $\text{MgSO}_4$  溶液(pH5.0)中, 经  $0.3\mu\text{m}$  灭菌微孔滤膜过滤除菌, 制备成复合酶液。将 PDA 斜面上培养 6 d 的 M6-22-4 菌种用无菌水制备孢子悬液, 稀释至  $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。500mL 三角瓶中装入  $100\text{mL}$  PDA 液体培养基, 接入上述孢子悬液  $1\text{mL}$ , 在  $30^\circ\text{C}$ 、 $180\text{r}/\text{min}$  摇床震荡培养 12h 后收集菌丝。然后称  $1\text{g}$  湿菌丝, 加入  $5\text{mL}$  复合酶液, 于  $30^\circ\text{C}$  下缓慢振荡培养 2~3h, 经 G2 漏斗过滤, 离心收集原生质体, 将沉淀溶于 STC。一方面将浓度调整到  $10^8$  个/mL  $4^\circ\text{C}$  保存以备转化。同时按照本实验方法, 对原生质体进行了再生实验。经重复实验和计算, 本实验所制备的 M6-22-4 原生质体再生率为 10.6%, 再生率远低于本实验室之前的报道, 其原因可能是本实验所用的培养基(查氏培养基加入 0.5% 酵母)营养远不如 PDA 培养基丰富的缘故。

### 2.3 深黄被孢霉的原生质体转化

深黄被孢霉 PD4 原生质体转化结果见表 1。

表 1 深黄被孢霉 HmB 抗性转化

Table 1 Transformation of *M. isabellina* to hygromycin B-resistance

PD4 plasmid	PD4 DNA/ $\mu\text{g}$	Type of PEG	Number of transformants/plate	Transformation frequency(number of transformants/ $\mu\text{gDNA}$ )
Ssp I Digested	10	PEG4000	16	1.6
	10	PEG6000	3	0.3
	10	PEG8000	0	0
	10	PEG4000	28	2.8
Circle plasmid	10	PEG6000	6	0.6
	10	PEG8000	2	0.2

从表 1 可看出, PD4 质粒得到了成功转化, 转化率为  $1.6 \sim 2.8$  个转化子/ $\mu\text{g}$  质粒 DNA。但转化板上的菌落大小不一, 说明其抗性水平可能不同。从进一步实验结果得出(1)质粒线性化虽然转化频率不

高, 但可以提高外源基因的整合效率。在本研究中, 我们对 PD4 质粒线性化(*Ssp I* 酶切)和非线性化转化作了比较。线性化 PD4 质粒的转化率明显低于非线性化的 PD4 质粒, 其转化率比例约为  $1:2 \sim 19:$

36)。但将获得的所有转化子全部转接在 PDA 培养基上培养,在连续传代 10 代后,再转回含有 HmB 的选择培养基上时,结果只有质粒线性化后获得的转化子中有 6 株(约 31.6%)可继续生长,其余均不能生长,可能是未整合到染色体基因组上的流产转化子。在培养过程中我们发现不同流产转化子随着转接代数的增加而抗性逐渐丢失;同时该实验结果表明质粒线性化有助于转化后外源基因到宿主染色体上的整合。这和 Lima<sup>[18]</sup>、杨炜<sup>[19]</sup>等报道的结果基本一致。(2)外源 DNA 导入感受态原生质体与 PEG 的相对分子量大小、浓度及  $Ca^{2+}$  浓度密切相关。本实验对 PEG4000、PEG6000 和 PEG8000 进行了对比。结果当采用 PEG4000 时,转化子数最多,达到 1.6~2.8 个转化子/ $\mu\text{g}$  质粒,采用 PEG6000 时平均不到 1 个转化子/ $\mu\text{g}$  质粒,而用 PEG8000 时几乎没有转化子产生。这可能是由于在较低浓度时,PEG 使细胞膜内的水、蛋白质和糖类分子形成氢键,使得原生质体连在一起而发生凝聚, $Ca^{2+}$  的存在又使得凝聚加强,这种细胞间凝聚易于使外源 DNA 进入而转化。而当 PEG 浓度过高或作用时间过长时,则易于使原生质体脱水破裂,失去再生活性,从而使转化率降低。(3)本实验所采用 PD4 质粒是由 pAN7-1 质粒改造而来。HmB 抗性基因在 PD4 质粒中是由高山被孢霉的 *his* H4.1 启动子启动表达,而在 pAN7-1 质粒中是由构巢曲霉 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*gpd*)启动子启动表达。*gpd* 启动子是一个强启动子,使 HmB 抗性在许多真菌中获得了成功转化<sup>[18-20]</sup>。本实验考虑到深黄被孢霉和高山被孢霉同为被孢霉属,具有较高的同源性,利用带有同源性较高的 *his* H4.1 启动子的 PD4 质粒转化可能会提高实验的转化率。但结果所获得转化率并不高,可能与 *his* H4.1 启动子在深黄被孢霉中启动 HmB 基因表达的强度较弱有关。此外,与其他实验报道一样,转化率较低可能还与原生质体在选择培养基上再生率低以及 HmB 对受体菌具有一定毒性有关。

#### 2.4 转化子的生理变化

实验分别提取了转化子和深黄被孢霉 M6-22-4 总脂肪酸,气相色谱分析结果表明,转化子各脂肪酸组成与对照相比未发生改变。而当在相同培养条件下(PDA 平板,30℃)静置培养,非稳定传代转化子在生长和形态上几乎没有什么改变;但稳定传代的转化子的形态和生理特性都发生了较明显变化:与 M6-22-4 相比,转化子的产孢量减少、菌落略变白、变小、边缘呈局限生长,转化子无论在固体或液体土豆培养基中培养均出现了明显的生长延迟现象,平

均比受体菌株 M6-22-4 延迟 1~2d。

#### 2.5 转化子 PCR 检测

为了进一步对转化子进行鉴定,随机挑取 3 株稳定传代的转化子,提取基因组 DNA,分别以 PD4 质粒 DNA 和深黄被孢霉基因组 DNA 为正、负对照,以潮霉素基因上下游引物 hph1 和 hph2 进行 PCR,结果检测到转化子基因组中含有大小约 1kb 的潮霉素基因条带,而 M6-22-4 没有(图 1),表明 HmB 抗性基因已经转入转化子染色体中。

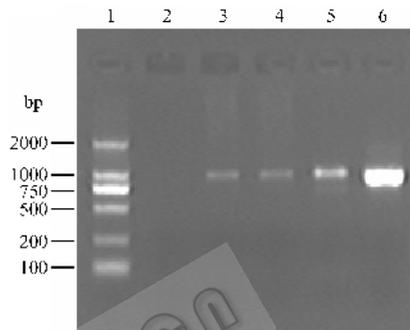


图 1 PD4 转化子的 PCR 检测

Fig.1 Identification of stable transformants by PCR with primers hph1/hph2

1: molecular marker; 2: PCR production of M6-22-4(negative control); 3~5: PCR production of transformants; 6: PCR production of PD4(positive control).

#### 2.6 转化子 Southern 杂交分析

为了检测质粒是否整合进转化子染色体 DNA,并获得转化子中质粒拷贝数的信息,实验以 PD4 转化子基因组作为模板,以 hph1 和 hph2 为上下游引物 PCR 扩增并回收 *hpt* 基因(1043bp)片段,<sup>32</sup>P 标记后作探针与稳定转化子进行 Southern 杂交(图 2)。结果表明,当以基因组总 DNA(不酶切)进行 Southern 杂交时,质粒 PD4(阳性对照)得到约 6.6kb 的带,三个转化子分别得到约 21kb 的带(图 2 A);当用 *Hin* III(在 PD4 上仅切割一次)彻底消化基因组 DNA 后进行 Southern 杂交时,三个转化子得到不同的结果(图 2 B)。表明 PD4 质粒以不同拷贝随机整合到转化子基因组中,而对照深黄被孢霉 M6-22-4 则没有任何杂交信号。

### 3 讨论与小结

本实验是对深黄被孢霉进行遗传转化的初步尝试。其中有些方面难免存在缺陷,例如,经过诱变所筛选的深黄被孢霉菌株 M6-22-4 对 HmB 药物的敏感性,虽然较出发菌 M6-22 大大降低,但是作为转化的受体菌仍然偏高,这将对引导表达的启动子的活性提出更高要求,同时也会增加使用 HmB 的成本。

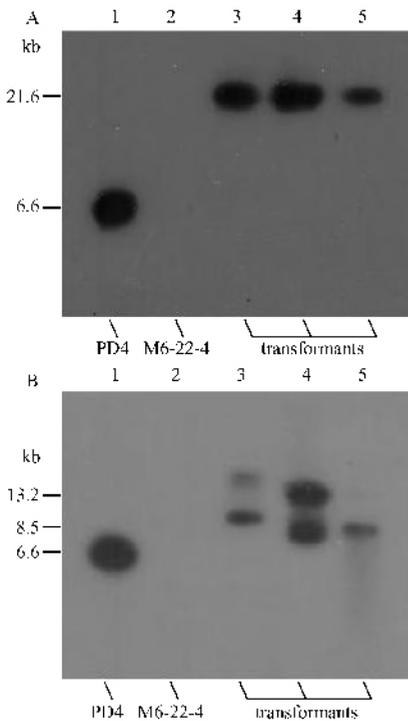


图2 转化子总 DNA Southern 杂交分析

Fig.2 Southern blot analysis of transformants

The blot was hybridized with a  $^{32}$ P-labeled hpt probe. Position of size markers (*Hind*III-digested  $\lambda$ ) are indicated.

(A) non-digested total DNA; (B) total DNA digested with *Hind*III.

1: plasmid PD4 (positive control); 2: M6-22-4 (negative control); 3~5: transformants.

另外,深黄被孢霉原生体制备比较麻烦,而且再生率不是很高。这些因素都可能导致实验转化率的降低。对此,根据已有文献报道,我们正在尝试利用农杆菌介导的转化方法进行转化,以期对实验结果有所改进。但总的来说,本实验 PD4 转化的成功,表明深黄被孢霉可以利用 HmB 抗性基因作遗传标记进行转化。这是潮霉素 B 抗性在深黄被孢霉转化的首次报道,该结果将对丝状真菌脱氢酶基因缺失突变株的构建及其分子遗传转化研究提供有用工具。

致谢 本实验中英国 Donald A. MacKenzie 教授 (The Institute of Food Research, Norwich, UK.) 友好赠送了 PD4 质粒并给予热情指导,在此作者表示衷心感谢。

## REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Certik M, Sakuradani E, Shimizu S. Desaturase-defective fungal mutants: useful tools for the regulation and overproduction of polyunsaturated fatty acids. *Trends in Biotechnology*, 1998, **16**: 500 - 505.

[ 2 ] Jareonkitmongkol S, Shimizu S, Yamada H. Fatty acid desaturase-defective mutants of an arachidonic-acid-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4. *Journal of General Microbiology*, 1992,

**138**: 997 - 1002

[ 3 ] Ruiz-Diez B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, **92**: 189 - 195.

[ 4 ] Muphy DJ, Piffaneth P. Fatty acid desaturase: structure mechanism and regulation. *Plant Lipid Biosynthesis: Recent Advances of Agricultural Importance*, 1998, **11**: 95 - 130.

[ 5 ] Yan P (闫培生), Luo XC (罗信昌), Zhou Q (周启). Advance and prospect of filamentous fungi gene engineering. *Advance of Biological Engineering (生物工程进展)*, 1999, **19**(1): 36 - 41.

[ 6 ] Gritz L, Davies J. Plasmid encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1983, **25**: 179 - 188.

[ 7 ] Kaster KR, Burgett SG, Rao RN, et al. Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and by DNA sequencing. *Nuclear Acids research*, 1983, **11**: 6895 - 6911.

[ 8 ] Kaster KR, Burgett SG, Ingolia TD. Hygromycin B resistance as dominant selectable marker in yeast. *Current Genetic*, 1984, **8**: 353 - 358.

[ 9 ] MacKenzie DA, Wongwathanarat P, Carter AT, et al. Isolation and use of a homologous histone H4 promoter and a ribosomal DNA region in a transformation vector for the oil-producing fungus *Mortierella alpina*. *Applied and Environment Microbiology*, 2000, **66**(11): 4655 - 4661.

[ 10 ] Queener SW, Ingolia TD, Skatrud PL, et al. A system for genetic transformation of *Cephalosporium acremonium*. In: *Schlessinger D. Microbiology*, American Sociate Microbiology, 1985, pp. 468 - 472.

[ 11 ] Yoder OC, Weltring K, Turgeon BG, et al. Technology for molecular cloning of fungal virulence genes. In: Bailey J A (Ed), *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*. NATO ASI Series H. *Cell Biology*, 1986, **1**: 371 - 384.

[ 12 ] Peter JP, Richard PO, Maria AD, et al. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *E. coli*. *Gene*, 1987, **56**: 117 - 124.

[ 13 ] Van den Elzen PJM, Townsend J, Lee KY, et al. A chimeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cell. *Plant Molecular Biology*, 1985, **5**: 299 - 302.

[ 14 ] Waldron C, Murphy EB, Roberts JL, et al. Resistance to hygromycin B. A new marker for plant transformation studies. *Plant Molecular Biology*, 1985, **5**: 103 - 108.

[ 15 ] Bernard HU, Krammer G, Rowekamp WG. Construction of a fusion gene that confers resistance against hygromycin B to mammalian cells in culture. *Experimental Cell Research*, 1985, **158**: 237 - 243.

[ 16 ] Zhong H (钟辉), Zhang J (张峻), Xing LJ (邢来君). Advance on produce of  $\gamma$ -linolenic acid with microbiological fermentation. *Microbiology (微生物学通报)*, 1994, **21**(4): 237 - 239.

[ 17 ] Li MC (李明春), Xing LJ (邢来君). Protoplast formation and regeneration of  $\gamma$ -Linolenic acid producing strain of *Mortierella isabellina*. *Mycosystema (菌物系统)*, 1997, **16**(1): 24 - 29.

[ 18 ] Lima JO, dos Santos JK, Pereira JF, et al. Development of a transformation system for *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants. *Current Genetic*, 2003, **42**: 236 - 240.

[ 19 ] Yang W (杨炜), Huang DN (黄大年), Wang JX (王金霞), et al. Transformation of the protoplasts of rice blast fungus with a selectable marker for hygromycin resistance. *Acta Genetica Sinica (遗传学报)*, 1994, **21**(4): 305 - 312.

[ 20 ] Zhu R (朱平), Yang JI (杨金玲), Zhu HX (朱慧新), et al. DNA transformation of *Gibberella fujikuroi* protoplast. *Mycosystema (菌物系统)*, 2000, **19**(2): 285 - 287.