

根癌农杆菌介导 *gfp* 基因转化水稻纹枯病菌及其对病原菌稳定性和致病力的影响

张俊华, 牟明, 常浩, 李云鹏, 范琳, 钟庆燕, 潘春清, 邹德堂

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 本文对根癌农杆菌介导 *gfp* 基因转化水稻纹枯病菌及其对病原菌稳定性和致病力的影响进行了系统研究。结果表明, 30 μg/mL 潮霉素 B 可作为转化子的筛选浓度, 水稻纹枯病菌遗传转化的最佳条件为: 共培养 AS 浓度为 250 μmol/mL, 预诱导时间为 9 h, 共培养温度为 26°C, 共培养时 pH 为 5.8 ~ 6.0, 共培养时间为 22 h。分别对随机选取的 5 个转化子进行荧光显微镜观察、PCR 扩增及测序。结果表明, 绿色荧光蛋白基因 *gfp* 已成功转化到水稻纹枯病菌中。转化子稳定性及致病力鉴定结果表明, 转化子连续转接 5 代后仍对潮霉素 B 具有抗性, 表明 *gfp* 成功转化到水稻纹枯病菌中且稳定遗传。转化子与野生型水稻病菌导致的水稻发病程度基本一致, 表明 *gfp* 遗传转化后对水稻纹枯病菌的致病力无显著影响。本研究结果为开展水稻纹枯病菌与水稻品种互作机制奠定了基础。

关键词: 根癌农杆菌; 绿色荧光蛋白; 水稻纹枯病菌; 遗传转化

中图分类号: S435.111.4⁺2

文献标志码: A

文章编号: 1003-8701(2016)06-0067-08

Agrobacterium Tumefaciens-Mediated Transformation of *gfp* Gene and Its Effects on Stability and Pathogenicity for *Rhizoctonia solani*

ZHANG Junhua, MU Ming, CHANG Hao, LI Yunpeng, FAN Lin, ZHONG Qingyan, PAN Chunqing, ZOU Detang
(College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In this paper, a *gfp* gene were introduced into the rice sheath blight fungus by agrobacterium mediated transformation and its effects on the stability and pathogenicity of the fungus investigated. The results showed that 30 μg/mL of selection agent hygromycin B could significantly inhibit the growth of *Rhizoctonia solani* on PDA medium. The optimized parameters for *A. tumefaciens* mediated transformation of *Rhizoctonia solani* were as follows: 250 μmol / mL of acetosyringone (AS) during the co-culture, pre-inducement time for 9 h, culture temperature at 26 °C, pH 5.8 ~ 6.0 during co-culture and the total culture time for 22 h. About 5 randomly selected transformants were analyzed by fluorescence microscope, sequencing and PCR. The results indicated that the *gfp* gene was transformed into *Rhizoctonia solani*. The stability and pathogenicity analysis of the transformed fungus showed that 5 transformants after continuous culture for five generations still showed resistance to the selection agent hygromycin B, confirming the stable inheritance of the *gfp* gene in the transformed rice sheath blight fungus. The transformed fungus exhibited similar disease severity as that of the wide type strain after inoculating rice, indicating that the pathogenicity of the *Rhizoctonia solani* was not significantly changed by introduction of the exogenous *gfp* gene. Our results would lay the foundation for further investigation on the interaction mechanism between *Rhizoctonia solani* and rice varieties.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*; Green fluorescent protein; *Rhizoctonia solani*; Genetic transformation

收稿日期: 2016-07-09

基金项目: 哈尔滨市应用技术与开发项目(2014AB6BN036); 黑龙江省粮食作物新品种选育及持续增产栽培技术创新平台项目(2011计划项目); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11551041); 博士后研究人员落户黑龙江科研启动资助项目(LBH-Q09172); 中央引导地方科技发展专项(2016)

作者简介: 张俊华(1973-), 男, 教授, 博士, 主要从事寄主与病原物互作研究。

水稻纹枯病是水稻生产中的主要病害之一,从秧苗期至穗期均可发生,以分蘖盛期至穗期受害最重,一般可以造成10%~30%的产量损失,高发病时可减产50%以上,是影响农业高产、稳产和优质的主要因素之一^[1]。在我国南方,其发生面积和所造成的损失均高于稻瘟病,成为水稻的第一大病害。在我国北方,为了提高水稻产量,当前生产上大面积推广矮秆、多蘖水稻品种,在栽培措施上,追求高密度和增施氮肥,这种单一品种的大面积种植和相应的栽培模式也为水稻纹枯病的发生流行提供了条件。对水稻纹枯病的研究多集中在病菌生物学及病害流行与防治方面,目前有关水稻纹枯病菌分子致病机制和水稻品种抗病机制研究较少,再加上生产上没有免疫和高抗的水稻品种,造成对水稻纹枯病的防治单纯依赖栽培措施和化学药剂,防治方法单一。建立水稻纹枯病菌转化体系是研究水稻纹枯病菌致病分子机制的基础。农杆菌介导的遗传转化目前已在 *Phytophthora blight*^[2]、*Didymella bryoniae*^[3]、*Normuraea rileyi*^[4]等真菌中转化成功。农杆菌介导的植物病原真菌的转化方法目前已成为植物病理学研究的重要手段,由农杆菌介导遗传转化产

生的真菌转化子具有易发生表型和致病性的突变,而且表型与T-DNA共分离的几率较高等特点,这为真菌功能基因的研究提供了可能^[5]。绿色荧光蛋白技术已广泛应用到病原菌与宿主互作的研究中,其可以直观、实时监测病原物的附着、侵染和定殖过程。本研究以携带潮霉素抗性的质粒pBGgHg及农杆菌C58C1为介导,以水稻纹枯病菌菌株RSAG-11A017为出发菌株,*gfp*被成功转化到水稻纹枯病菌中,为研究水稻纹枯病菌的致病分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

供试菌株为东北农业大学植物病理研究室分离鉴定保存的强致病力水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)菌株RSAG-11A017。农杆菌菌株C58C1由中国农业科学院作物所徐兆师副研究员提供。

1.1.2 质粒

质粒pBGgHg由美国宾夕法尼亚州立大学植病系提供。

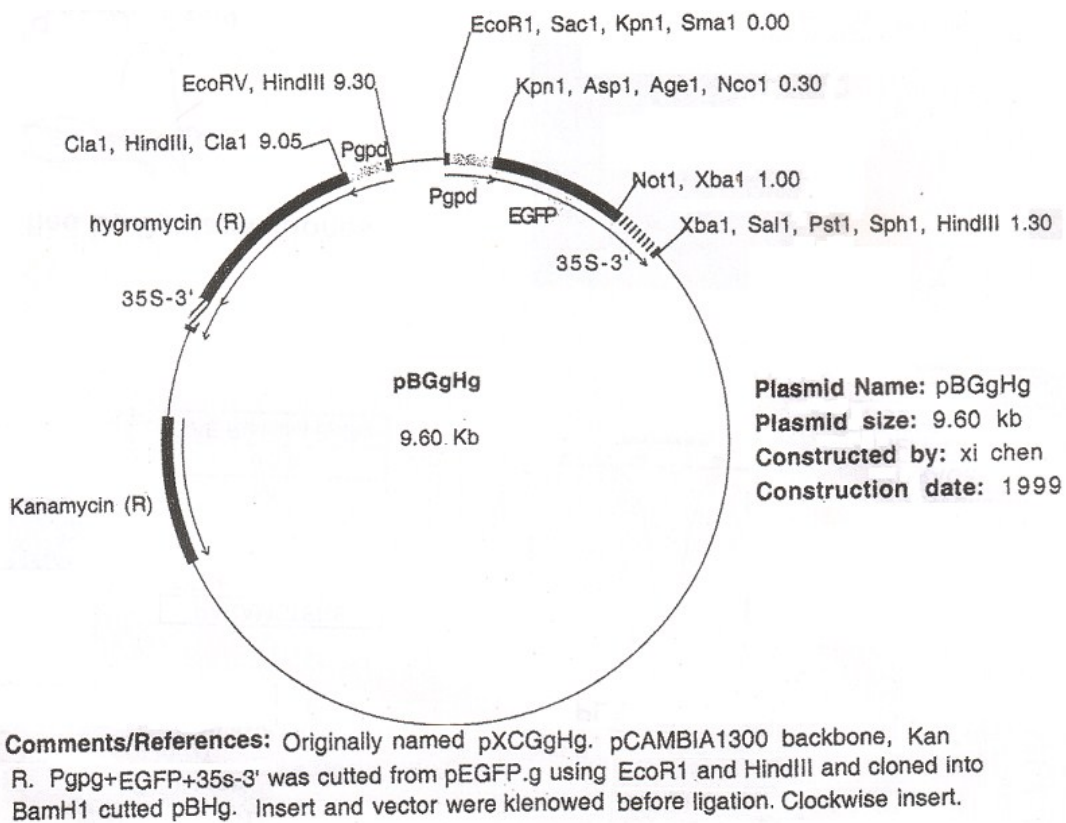


图1 转化质粒图谱 pBGgHg

1.1.3 培养基

参考贺春萍等^[6]的方法配制:MM液体培养基(用于农杆菌培养)、LB培养基(用于农杆菌的培养)、诱导培养基IM(用于转化子的培养)、PDB液体培养基和PDA培养基(用于水稻纹枯病菌的培养)。

1.1.4 抗生素及生化试剂

卡那霉素、潮霉素B等抗生素购自Sigma公司;Tag DNA聚合酶购自NEB公司;其他试剂购自上海伯奥生物科技公司。

1.2 转化用农杆菌液的准备

参照张俊华等^[7]的方法,利用冻融法将质粒pBGgHg导入到农杆菌C58C1中。将农杆菌转到含有50 μ g/mL卡那霉素的LB平板上培养,挑取农杆菌单菌落转移到体积为6 mL LB液体培养基(含有50 μ g/mL卡那霉素)中,300 r/min,28 $^{\circ}$ C培养24 h后,再用含250 mmol/L AS的MM培养液稀释,测量OD₆₆₀,当OD₆₆₀大约0.15,再继续培养6 h,至OD₆₆₀为0.6~0.8备用。

1.3 水稻纹枯病菌的培养

将菌株RSAG-11A017接种到PDA培养基及PDB液体培养基中培养备用。

1.4 水稻纹枯病菌对潮霉素B敏感性测定

参照杨迎青等^[8]的方法,分别设置潮霉素浓度为0 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、15 μ g/mL、20 μ g/mL、25 μ g/mL、30 μ g/mL和35 μ g/mL共8个处理浓度,每个处理重复3次。配置含有潮霉素不同浓度梯度的PDA平板,将水稻纹枯病菌活化培养后,沿着菌落边缘打成直径为5 mm的菌饼,将菌饼置于含有上述不同浓度潮霉素的PDA平板上,26 $^{\circ}$ C温箱内培养6 d。为进一步确定潮霉素的筛选浓度,将用PDB培养液培养36 h的菌丝捣碎后加入无菌水配制成悬浮液,将菌丝悬浮液均匀地涂在含不同浓度潮霉素的PDA平板上,潮霉素B的终浓度分别为0 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、15 μ g/mL、20 μ g/mL、25 μ g/mL、30 μ g/mL和35 μ g/mL共8个处理浓度,每个处理重复3次,观察菌落生长情况,并测量菌落直径。

1.5 绿色荧光表达载体转化与转化子的获得

参考Mullins等^[9]的方法,将野生型菌株RSAG-11A017接种到PDA平板上,26 $^{\circ}$ C培养6 d,沿着菌落边缘,用直径为5 mm的打孔器打成菌饼,取5块菌饼放入装有PDB培养液的三角瓶(100 mL)中,26 $^{\circ}$ C,160 r/min振荡培养6 d后,取少量菌丝用捣碎机将菌丝打碎,取0.1 g菌丝加入5

mL IM混匀。取100 μ L稀释好的水稻纹枯病菌菌丝液和100 μ L预诱导的农杆菌混合,然后置于含有250 μ mol/L AS的SIM诱导培养基上进行共培养。培养24 h后将混合纤维素膜(孔径0.45 μ m)转到PDA平板上(含30 μ g/mL潮霉素B)。26 $^{\circ}$ C下培养6 d,在PDA平板上(30 μ g/mL含有潮霉素B)进行复筛。将得到的转化子放入低温冰箱中保存备用。

1.6 水稻纹枯病菌转化体系优化

按照1.5的转化方法,对影响水稻纹枯病菌遗传转化的主要因子逐一进行试验。AS浓度分别设置0 μ mol/mL、50 μ mol/mL、100 μ mol/mL、150 μ mol/mL、200 μ mol/mL、250 μ mol/mL、300 μ mol/mL和400 μ mol/mL 8个处理,预诱导时间分别设置为3 h、5 h、7 h、9 h和11 h等5个处理,共培养温度分别设置为22 $^{\circ}$ C、24 $^{\circ}$ C、26 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C和32 $^{\circ}$ C等6个处理,共培养时分别设置SIM培养基pH值为5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0和7.2等12个处理,共培养时间分别设置为10、12、16、18、22、24、28和32 h等8个处理,每个处理重复3次。按照前面因子已确定的最优条件进行后续因子的优化试验。用每皿平均转化子数目来说明转化效率的差异。

1.7 转化子的致病性测定

种植水稻品种nipponbare,常规管理。参照Park等^[10]的方法,将5个转化子和野生型水稻纹枯病菌转入PDA培养基中,26 $^{\circ}$ C培养6 d,用打孔器将菌落边缘打成直径为5 mm的菌饼,置PDB培养液中培养,140 r/min,培养6 d,2 000 r/min离心5 min,将菌丝制成菌丝球(直径5 mm)贴在8周水稻植株的叶鞘上,用锡箔纸保湿,放入28 $^{\circ}$ C光照培养箱中培养。保湿2 d后去掉锡箔纸,7 d后记录叶鞘发病病斑长度,每个处理重复3次。

1.8 转化子稳定性测定

随机性挑取5个转化子,接种到PDA平板上,26 $^{\circ}$ C恒温箱中培养6 d后,挑取平板菌落边缘的菌丝转接新的PDA平板中,共转接4代,将第5代转化子接种到PDA培养基(含30 μ g/mL潮霉素B)上培养,挑取转化子的菌丝制成玻片,以野生型菌株RSAG-11A017为对照,在荧光显微镜(Nikon90 i)下观察和照相。

1.9 PCR验证转化子

参考吴荷芳等^[11]的方法,采用Transgen吸附柱法DNA提取试剂盒提取DNA,由于载体pBGgHg含有潮霉素基因,以潮霉素基因序列设计一对引

物 (hphF: 5'-GTGCTTTCAGCTTCGATG-3', hphR: 5'-AACCAAGCTCTGATAGAG-3'), 利用设计的引物进行转化子 PCR 扩增。反应体系为: 模板 DNA 1 μ L, 10 \times PCR buffer (含 2 mmol/L $MgCl_2$) 2.5 μ L, Taq 酶 (5U/ μ L) 0.4 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1.5 μ L, hphF primer (20 mmol/L) 1 μ L, hphR primer (20 mmol/L) 1 μ L, 加入 ddH₂O 定容为 25 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}C$ 预变性 6 min, 94 $^{\circ}C$ 35 s, 42 $^{\circ}C$ 40 s, 72 $^{\circ}C$ 3 min, 共 33 个循环, 72 $^{\circ}C$ 延伸 8 min。用 0.8% 琼脂糖电泳检测扩增产物。

1.10 显微镜验证转化子

选取经多代培养的转化子转接到 PDA 平板上, 26 $^{\circ}C$ 培养 6 d, 挑取菌丝制片, 荧光显微镜 (Nikon 90i) 下观察和照相。

2 结果与分析

2.1 水稻纹枯病菌农杆菌介导转化

2.1.1 水稻纹枯病菌对潮霉素 B 的敏感性

26 $^{\circ}C$ 培养 6 d 后测量菌落直径, 菌饼接种在 PDA 平板 (含 30 μ g/mL 潮霉素 B) 上没有菌丝生长, 潮霉素 B 浓度为 5 ~ 25 μ g/mL 的 PDA 平板上均有水稻纹枯病菌菌丝的生长, 未加潮霉素 B 的 PDA 平板上已经长满菌丝并形成菌核。与接种菌饼相似, 菌丝碎段在含有浓度为 25 μ g/mL 潮霉素 B 的 PDA 平板上也没有菌丝的生长, 而在未加潮霉素 B 的 PDA 平板上已经长满菌丝并形成菌核。因此本研究以 30 μ g/mL 潮霉素 B 作为转化子的筛选浓度。

2.1.2 共培养时 AS 浓度对水稻纹枯病菌转化的影响

如图 2 所示, 乙酰丁香酮 (AS) 浓度影响农杆

菌对水稻纹枯病菌转化效率, 当不加入 AS 时, 每皿仅获得 50 个转化子, 随着 AS 浓度的增加, 每皿获得的转化子数量增加, 当 AS 浓度为 200 μ mol/mL 时, 每皿可产生 114 个转化子, 当 AS 浓度为 250 μ mol/mL 时, 每皿可产生 130 个转化子, 但当 AS 浓度为 300 μ mol/mL 和 400 μ mol/mL 时, 每皿可分别产生 132 和 135 个转化子, 与 AS 浓度超过 250 μ mol/mL 时相比, 每皿可获得的转化子数量增加幅度不大, 综合考虑认为 AS 最佳浓度为 250 μ mol/mL。

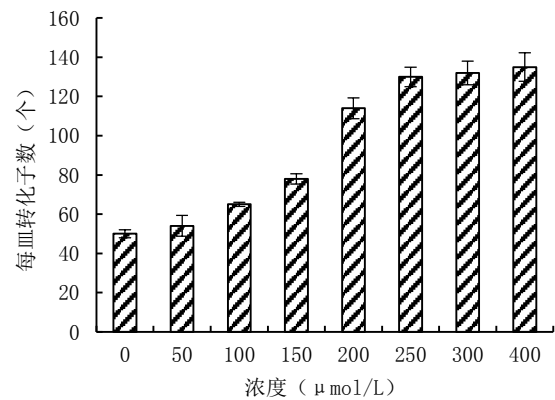


图 2 乙酰丁香酮浓度对水稻纹枯病菌转化的影响

2.1.3 预诱导时间对水稻纹枯病菌转化的影响

预诱导时间是影响水稻纹枯病菌转化效率的因素之一, 水稻纹枯病菌遗传转化效率随着预诱导时间的增加而增加, 预诱导时间为 3 h, 每皿转化子数仅为 10 个, 预诱导 9 h 农杆菌的 OD₆₀₀ 为 0.30, 预诱导 11 h 时农杆菌 OD₆₀₀ 为 0.33 (如图 3A), 虽然预诱导时间 11 h 每皿平均转化子数量比 9 h 都要多一些, 但前者 and 后者差异并不显著 (如图 3B)。综合考虑确定 9 h 为最佳预诱导时间。

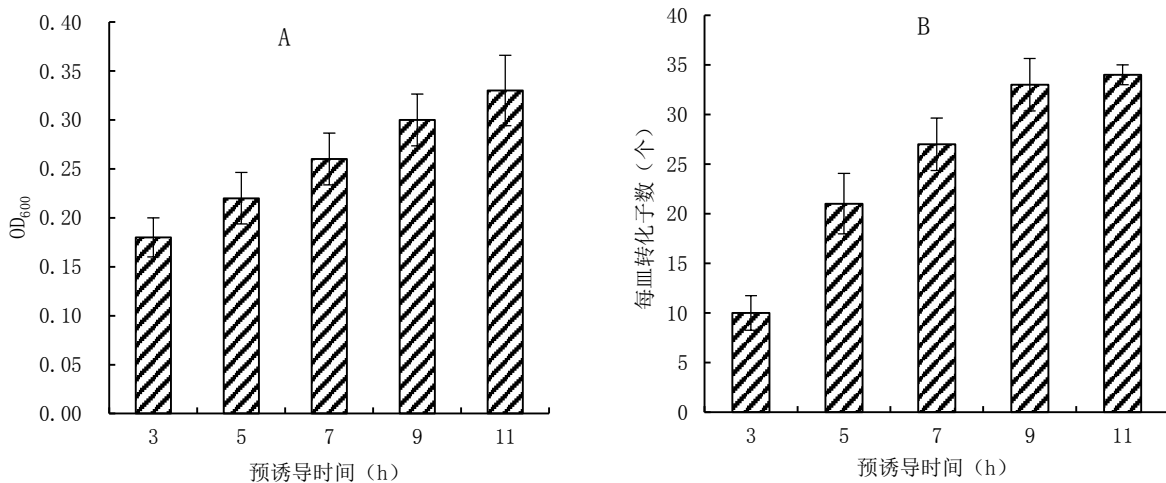


图 3 预诱导时间对水稻纹枯病菌转化的影响

2.1.4 共培养温度对水稻纹枯病菌转化的影响

如图4所示,在22~32℃范围内,转化子数量随着温度升高而增多,26℃时获得转化子数量最多,每皿转化子个数为92个,但当温度升高到28℃、30℃及32℃时,每皿转化子数量又开始降低,分别为84个、66个和47个。因此,水稻纹枯病菌遗传转化最佳的共培养温度为26℃。

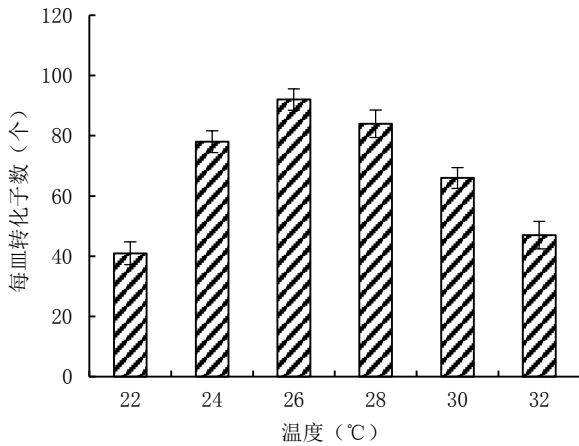


图4 共培养温度对水稻纹枯病菌转化的影响

2.1.5 共培养pH值对水稻纹枯病菌转化的影响

共培养pH的高低也会影响农杆菌的侵染效果,不同pH的SIM培养基共培养得到不同数量的转化子,当pH为7.2时转化效率最低,每皿转化子数量仅为12个,当pH为5.8时,每皿转化子数量达到最高,为78个,但与共培养pH 6.0的差异不显著(如图5),因此可得出结论,pH5.8~6.0共培养基较适宜水稻纹枯病菌的遗传转化。

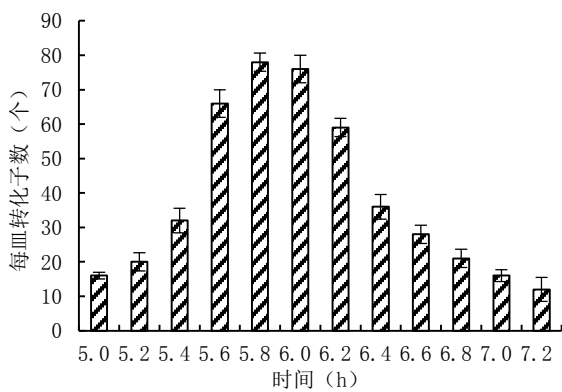


图5 共培养时pH值对水稻纹枯病菌转化的影响

2.1.6 共培养时间对水稻纹枯病菌转化的影响

如图6所示,在10~32h范围内,转化子数量随着共培养时间的增长而增多,当共培养22h时,平均每皿转化子数量为65个,随后转化效率进入稳定的平台期,尽管共培养24、28、32h每皿平均转化子数量比22h略多,但一方面考虑时间

效率,另一方面随着转化子插入T-DNA的拷贝数量因共培养时间增多而增加,这样会给后续转化子分析带来困难,本研究认为水稻纹枯病菌的最佳共培养时间为22h。

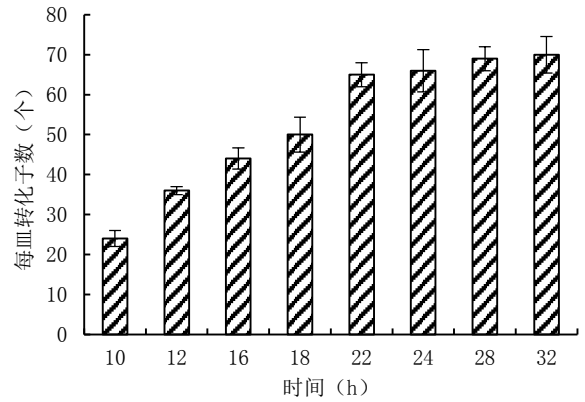


图6 共培养时间对水稻纹枯病菌转化的影响

2.1.7 转化子的致病力测定

如图7所示,将野生型水稻纹枯病菌和5个转化的水稻纹枯病菌分别接种到8周的nipponbare水稻品种的叶鞘上,接种7d后调查叶鞘的病斑长度,5个转化后的水稻纹枯病菌均能导致水稻发病,和野生型水稻纹枯病菌相比,导致水稻植株发病程度基本一致。表明gfp遗传转化后对水稻纹枯病菌的致病力没有显著影响(如表1)。

表1 病斑长度及显著性分析

菌株名称	病斑平均长度	显著性分析	
		5%	1%
RSAG-11A017	5.14	a	A
Transformant1	4.79	b	B
Transformant2	4.94	ab	AB
Transformant3	5.12	a	A
Transformant4	4.92	ab	AB
Transformant5	5.01	ab	AB

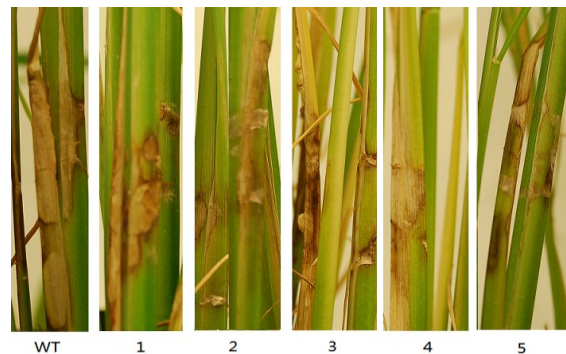


图7 水稻纹枯病菌转化子的致病力测定

WT:野生型水稻纹枯病菌(RSAG-11A017);1-5:5个转化子

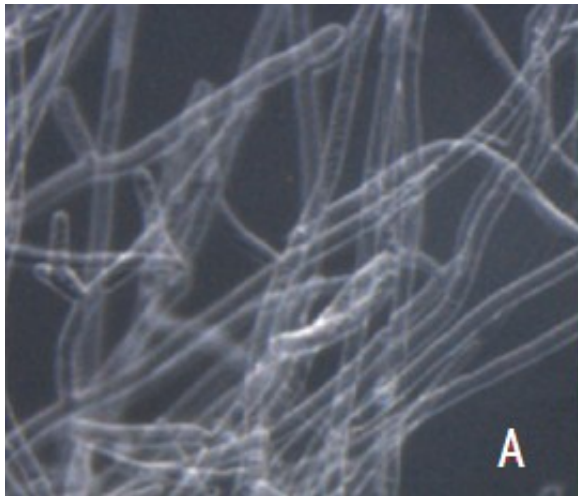
2.1.8 转化子遗传稳定性的测定

将选取的5个转化子转接到PDA平板上培养,连续转接5代后,挑取菌丝转接到PDA平板(含有30 μ g/mL的潮霉素B)上培养,这5个转化后的水稻纹枯病菌均能正常生长,表明这5个转化子对潮霉素B仍具有抗性,已将*gfp*基因成功转化到水稻纹枯病菌基因组中,而且能够稳定遗传。

2.2 PCR验证转化子

分别以野生型菌株RSAG-11A017的DNA及质粒pBGgHg为阴性和阳性对照,随机选取5个转化子提取其基因组DNA并采用潮霉素基因特异性引物进行PCR扩增,结果显示,质粒pBGgHg和这5个转化子均能扩增出约750bp的目的片段(如图8),野生型菌株RSAG-11A017没有扩增出目的片段,表明已将*gfp*基因成功整合到转化子基因组中。

2.3 显微镜验证转化子



随机挑取转化子和野生型菌株的菌丝制片放在荧光显微镜下进行观察,转化子的菌丝均能发出绿色荧光,而野生型菌株的菌丝没有观察到任何荧光(如图9),说明*gfp*基因已被成功转入水稻纹枯病菌中。

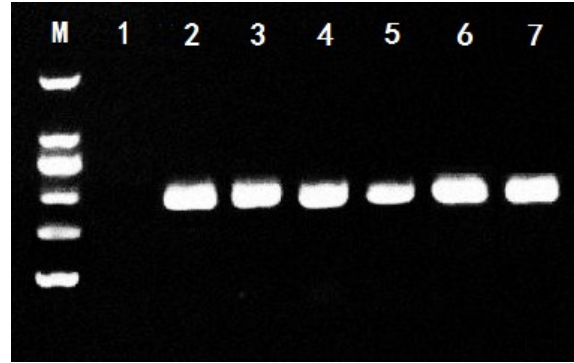


图8 转化子的PCR验证

M: DL 2000Marker; 1:野生型; 2-6:5个转化子;7:质粒pBG-gHg

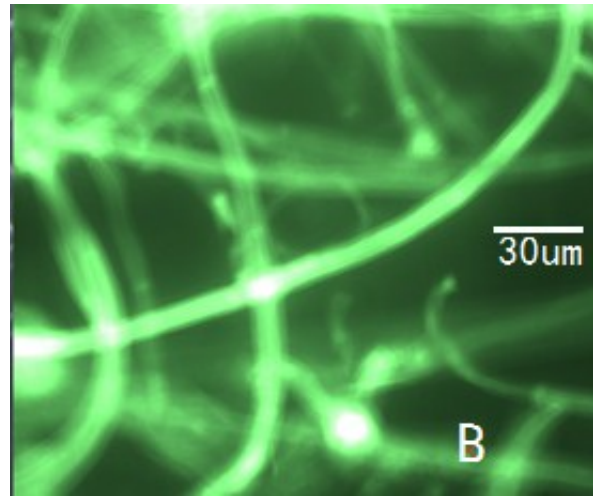


图9 显微镜验证转化子

A:野生型菌株 B:转化子

3 讨论

真菌的原生质体、孢子、菌丝体可作为农杆菌介导的遗传转化的原材料,个别真菌只能以原生质体、孢子或菌丝体中的一种作为农杆菌遗传转化的原材料。Michielse等在转化*Rhizopus oryzae*时发现,只有原生质体能够获得转化子,孢子作为原材料不能完成转化^[12],Cardoza等在遗传转化*Trichoderma spp.*时,以菌丝或分生孢子作为转化

对象均成功完成转化^[13],本研究以水稻纹枯病菌菌丝体完成转化。

对于农杆菌介导转化水稻纹枯病菌体系,国内外相关报道甚少,Wu等^[14]利用农杆菌介导转化*Rhizoctonia solani*菌丝体,以*Schizophyllum commune*的GPD启动子作为*hph*的启动子,以潮霉素B作为选择性标记,构建载体pJW2.2hyg-15,研究表明AG-6菌株获得抗性菌株,AG-3和AG-4菌株都没有得到抗性菌株,表明不同*Rhizoctonia so-*

lani 融合群的转化能力不同。本研究以根癌农杆菌 C58C1 作为转化介体,以含有 *gfp* 报告基因的 pBGgHg 作为转化载体,将 *gfp* 成功地转化到水稻纹枯病菌的强致病菌株 RSAG-11A017 中。

农杆菌转化效率高受到多种因素的影响,这些因素包括农杆菌菌株类型、转化受体类型、乙酰丁香酮浓度、共培养温度、共培养 pH 和共培养时间等。乙酰丁香酮直接影响真菌遗传转化成功与否,也是诱导毒性基因表达的因素之一。本研究结果表明 AS 浓度的高低影响 *Rhizoctonia solani* 遗传转化效率,这与任海英和 Wang 等研究成果一致^[3, 15]。在预诱导时间方面,杨迎青在转化水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) 时以 8 h 作为最佳预诱导时间^[8],本研究表明水稻纹枯病菌的遗传转化适合预诱导时间为 9 h。在共培养温度方面,本研究对共培养温度对农杆菌转化效率的影响进行研究,结果表明 26℃ 为农杆菌介导水稻纹枯病菌转化的最适温度,与孙志光^[16]和毕方铖等^[17]的研究结果相似。共培养 pH 是影响真菌转化效率的另一个因素,本研究结果表明对水稻纹枯病菌共培养 pH 为 5.8 ~ 6.0。这一结果与杨迎青在对水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) 转化时最适宜的共培养 pH 为 5.6 ~ 5.8 接近^[8]。在共培养时间方面,不同学者针对不同类型真菌的研究结果不同,李敏慧等^[18]认为香蕉枯萎病菌的共培养时间必须超过 48 h,方丽等对炭疽菌的转化研究认为 24 h 是共培养最佳时间^[19],杨迎青等在对水稻纹枯病菌转化时的共培养时间为 20 h^[8],本研究认为 22 h 适合水稻纹枯病菌的遗传转化。

关于转化子稳定性方面,杨迎青在水稻纹枯病菌遗传转化研究中,选取 10 个转化子在无潮霉素选择压力下连续转接 5 代,再转入含潮霉素的 PDA 培养基上培养 36 h 后,菌落直径达到 7 ~ 8 cm,说明外源 T-DNA 已经整合到水稻纹枯病菌中且能稳定遗传^[8]。刘海青对利用农杆菌转化的禾谷镰刀菌的转化子进行了稳定性测定,随机挑取 10 个转化子在含有潮霉素 PDA 培养基上转代 4 次后仍能看到荧光,说明转化子在遗传上是稳定的^[20]。本研究选取 5 个转化子转接到 PDA 平板上培养,连续转接 5 代后,挑取菌丝转接到含有潮霉素 PDA 平板上培养,这 5 个转化后的水稻纹枯病菌均能正常生长,表明这 5 个转化子对潮霉素 B 仍具有抗性,已将 *gfp* 基因成功转化到水稻纹枯病

菌基因组中,而且能够稳定遗传。关于转化子致病力方面,刘海青选取 4 个转化子利用注射法接种小麦,发现转化子的发病程度要比野生菌株轻,说明这些转化子降低了致病力^[20],本研究将野生型水稻纹枯病菌和 5 个转化的水稻纹枯病菌分别接种到 8 周的 nipponbare 水稻品种的叶鞘上,接种 7 d 后调查叶鞘的病斑长度,5 个转化后的水稻纹枯病菌均能导致水稻发病,和野生型水稻纹枯病菌相比,导致水稻植株发病程度基本一致。表明 *gfp* 遗传转化后对水稻纹枯病菌的致病力影响不大。

参考文献:

- [1] 金荣德,闫海洋,孙 卉,等.产酶溶杆菌在水稻纹枯病生物防治中的应用研究[J].吉林农业科学,2014,39(1):51-55.
- [2] M Schubert, C Stührk, M J Fuhr, et al. Agrobacterium-mediated transformation of the white-rot fungus *Physisporinus vitreus*[J]. Microbiol. Methods, 2013, 95(2): 251-252.
- [3] 任海英,方 丽,李 岗,等.农杆菌介导的甜瓜蔓枯病菌遗传转化体系的建立[J].生物工程学报,2010,26(6):802-808.
- [4] Changwen Shao, Youping Yin, Zhaoran Qi, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 83: 19-25.
- [5] 金永梅,马 瑞,于志晶,等.利用农杆菌介导的共转化法获得含双 Bt 基因转基因水稻[J].吉林农业科学,2014,39(5):26-29.
- [6] 贺春萍,林春花,廖奇享,等.水稻纹枯病 T-DNA 插入突变体库构建及致病相关突变体筛选[J].热带作物学报,2007,28(1):80-84.
- [7] 张俊华,刘 焯,韩雨桐,等.农杆菌介导稻瘟病菌绿色荧光蛋白(GFP)遗传转化研究[J].东北农业大学学报,2014,45(11):1-7.
- [8] 杨迎青,杨 媚,李明海,等.根癌农杆菌介导的水稻纹枯病菌转化系统的建立[J].中国水稻科学,2010,24(6):617-622.
- [9] Mullins E D, Kang S. Transformation: A tool for studying fungal pathogens of plants[J]. Cell Mol life Sci, 2001, 58: 2043-2052.
- [10] Park D S, Sayler R J, Hong Y G, et al. A method for inoculation and evaluation of rice sheath blight disease[J]. Plant Dis, 2008, 92: 25-29.
- [11] 吴荷芳,王晓宇,罗楚平,等.江苏省水稻纹枯病菌遗传多样性分析与致病力研究[J].江苏农业学报,2013,29(1):51-59.
- [12] Michielse C B, Hooykaasp J J, Vanden Hondel C J, et al. Agrobacterium mediated transformation as tool for functional genomics in fungi[J].Current genetics, 2005, 48(1): 1-7.

- [13] Cardoza R E, Vizcaino J A. A comparison of the phenotypic and genetic Stability of recombinant *Trichoderma spp.* generated by proto-plast and *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *The Journal of Microbiology*, 2006, 44(4): 383-395.
- [14] Wu J, Brien P A. Stable transformation of *Rhizoctonia solani* with a modified hygromycin resistance gene[J]. *Australasian plant pathology*, 2009, 9: 46-47.
- [15] Dongyang Wang, Dan He, Guangquan Li, et al. An efficient tool for random insertional mutagenesis *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus terreus*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 98: 114-118.
- [16] 孙志光. 农杆菌介导转化水稻纹枯病菌原生质体体系的构建及优化[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
- [17] 毕方铤, 戴宏芬, 孟祥春. 农杆菌介导的芒果胶孢炭疽菌遗传转化及致病性缺陷突变体的筛选[J]. *热带农业科学*, 2014, 34(8): 47-51.
- [18] 李敏慧, 张 荣, 姜大刚, 等. 根癌农杆菌介导的香蕉枯萎病菌4号生理小种的转化[J]. *植物病理学报*, 2009, 39(4): 405-412.
- [19] 方 丽, 宋凤鸣. 农杆菌介导的黄瓜炭疽菌遗传转化[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2006, 32(4): 360-366.
- [20] 刘海青. 农杆菌介导的禾谷镰刀菌遗传转化及转化子性质的初步研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.

(责任编辑: 范杰英)