

农杆菌介导樱桃干腐病菌的遗传转化

王海艳 李保华 李桂舫 王彩霞

(青岛农业大学 农学与植物保护学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东 青岛 266109)

摘要:以携带潮霉素磷酸转移酶基因的 pBIG3C 为转化载体, 根癌农杆菌 EHA105 为转化介体, 对樱桃干腐病菌 LXS230101 分生孢子进行转化。结果表明, 樱桃干腐病菌的最优转化体系为: α 型分生孢子浓度为 10^6 个/mL, 培养基中添加 $200 \mu\text{mol/mL}$ 乙酰丁香酮(AS), 共培养温度和时间分别为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 72 h, 其转化效率为 1×10^6 个 α 型分生孢子产生 686 个转化子。随机选取转化子进行 PCR 和 Southern blot 鉴定, 发现 T-DNA 已整合进樱桃干腐病菌基因组中; 转化子在不含潮霉素的 PDA 培养基中连续培养 5 代后, 仍表现出对潮霉素的抗性, 表明外源基因能在樱桃干腐病菌中稳定遗传。

关键词: 樱桃干腐病菌; 遗传转化; 转化效率; 转化子鉴定

中图分类号: S436.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)04-0218-05

Transformation of *Phomopsis perniciosa* Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

WANG Hai-yan, LI Bao-hua, LI Gui-fang, WANG Cai-xia

(Department of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University,

Key Lab of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province, Qingdao 266109, China)

Abstract: We developed an *Agrobacterium*-mediated transformation system for *P. perniciosa* by using the α -conidia of strain LXS230101 as transformation recipients, *A. tumefaciens* strain EHA105 carrying plasmid pBIG3C harboring the hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*). Successful transformation of *P. perniciosa* was performed and the highest efficiency reached on 686 transformants per 1×10^6 spores. The optimal transformation conditions were that 1×10^6 spores per milliliter of *P. perniciosa* α -conidia suspension were co-cultured with *Agrobacterium* cells at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ for 72 h in the presence of Co-culture medium containing acetosyringone (AS) at $200 \mu\text{mol/mL}$. The transformants were verified by PCR amplification and by Southern blot analysis with the *hph* primers and probe respectively. The results showed that all the detected transformants could be amplified the target bands and the T-DNA was inserted into the genome of *P. perniciosa*. In addition, the transformants were stable when grown on PDA medium without hygromycin for five times.

Key words: *Phomopsis perniciosa*; Genetic transformation; Transformation efficiency; Transformants identification

胶东半岛是我国樱桃的重要主产区,近年来樱桃干腐病在该地区发生普遍,严重影响樱桃的产量和品质,干腐病多发生在主干和主枝上,发病初期病斑暗褐色,常溢出茶褐色黏液,后病部干缩凹陷,病斑边缘树皮开裂,表面密生大量黑色的分生孢子器,严重时可导致整个枝干枯死^[1]。2009年,在山东烟台地区商品樱桃园中首次发现干腐病,并通过病菌

形态学观察、分子生物学及致病性测定,证实该病原菌为拟茎点霉(*Phomopsis perniciosa*)^[2]。拟茎点霉可产生2种类型的分生孢子, α 型分生孢子和 β 型分生孢子,后者不能萌发,不具有侵染性^[3]。此外,*Phomopsis* spp. 还能侵染桃树、梨树、杏树、蓝莓等重要经济作物,造成枝干溃疡及顶梢枯死,严重制约着果树的安全生产^[4-5]。目前,有关拟茎点霉病

收稿日期:2013-05-17

基金项目:国家自然科学基金项目(31000891;31272001);现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-28);山东省科技攻关计划项目(2010GNC10918);“泰山学者”建设工程专项经费项目

作者简介:王海艳(1987-),女,山东潍坊人,在读硕士,主要从事果树真菌病害研究。

通讯作者:王彩霞(1977-),女,山东德州人,副教授,博士,主要从事果树病害研究。

原学的研究还比较落后,关于该病菌的功能基因及其与寄主的互作研究尚未见报道。因此,建立一种简便、高效的樱桃拟茎点霉转化体系对研究该病菌功能基因以及樱桃干腐病菌互作具有重要意义。

在众多真菌遗传转化方法中,农杆菌介导的遗传转化技术 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 由于转化效率高和操作简便等优点而备受关注^[6-8]。自 Groot 等^[9]首次将 ATMT 技术应用于丝状真菌的遗传转化以来,该技术目前已在稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*)、玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*)、香蕉炭疽病菌 (*Colletotrichum musae*) 等多种真菌的遗传转化中得到广泛应用^[10-12]。本研究以樱桃干腐病菌 α 型分生孢子为转化受体,利用根癌农杆菌 EHA105 及携带潮霉素抗性的质粒 pBIG3C 进行转化,筛选获得干腐病菌的 T-DNA 插入转化子,旨在建立并优化干腐病菌的遗传转化体系,为樱桃干腐病菌功能基因研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

樱桃干腐病菌 (*P. perniciosus*) 菌株 LXS230101, 分离自山东海阳商品樱桃园,经单孢分离后由山东省植物病虫害综合防控重点实验室保存。供试根癌农杆菌 *A. tumefaciens* 菌株为 EHA105, 由山东省植物病虫害综合防控重点实验室保存。含潮霉素抗性基因的质粒 pBIG3C 由中国农业大学彭友良教授转赠。

1.2 供试培养基及试剂

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 15 g, 加水定容至 1 000 mL, 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min 备用。

YEP 培养基: 胰蛋白胨 (Bacto-tryptone) 10 g, 酵母膏 (Yeast extract) 5 g, 氯化钠 5 g, 琼脂粉 15 g, pH 值 7.0, 加水定容至 1 000 mL, 分装后 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。

MM 基本培养基: 磷酸氢钾缓冲液 10 mL (K-Buffer: K_2HPO_4 200 g/L, KH_2PO_4 145 g/L, pH 值 7.0), 硫酸镁-氯化钠溶液 20 mL (M-N Buffer: 30 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g/L NaCl), 1% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (m/V) 1 mL, 20% 葡萄糖 (m/V) 10 mL, 20% NH_4NO_3 (m/V) 2.5 mL, 0.01% $FeSO_4$ (m/V) 10 mL, pH 值 7.0, 加水定容至 1 000 mL。

IM 诱导培养基: K-Buffer (pH 值 4.9) 0.8 mL, M-N Buffer 20 mL, 1% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (m/V) 1 mL,

20% 葡萄糖 (m/V) 10 mL, NH_4NO_3 2.5 mL, 50% 甘油 10 mL, 补足双蒸水至 1 000 mL。IM 在使用之前加 0.01% $FeSO_4$ (m/V) 10 mL, 1 mg/mL 2-(N-吗啉基) 乙磺酸钠 (MES) 10 mL。

Co-IM 共培养培养基: 同 IM 培养基, 仅 20% 葡萄糖 (m/V) 用量减半。

1.3 抗生素对供试樱桃干腐病菌和农杆菌的影响试验

配置含潮霉素 B 质量浓度梯度为 0, 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PDA 平板, 用 6 mm 打孔器取同等菌龄和直径的樱桃干腐烂病菌 LXS230101 接种在含不同潮霉素浓度的 PDA 平板中心, 25 °C 培养 7 d 后, 观察菌落生长情况, 量取菌落直径。每个处理重复 3 次。

配制含头孢噻肟钠质量浓度梯度为 0, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PDA 平板, 取农杆菌菌液 ($OD_{600} = 0.15$) 100 μL 均匀涂布在平板上, 待菌液被完全吸收后, 28 °C 倒置培养 3 d 观察菌落生长情况。每处理 3 次重复。

1.4 樱桃干腐病菌分生孢子的诱导及农杆菌菌液的制备

采用电激法将质粒 pBIG3C 转化到农杆菌 EHA105 中, 后涂布于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平的 YEP 平板上, 置于 28 °C 倒置培养 2 d; 挑取单克隆接种于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 MM 培养基中, 28 °C 振荡培养 (150 r/min) 1 ~ 2 d, 用 IM 培养基稀释至 OD_{600} 为 0.15, 继续培养 6 h 备用。

将 *P. perniciosus* 菌株 LXS230101 先在 PDA 培养基上进行活化, 打取菌饼转接到新的 PDA 平板上, 待菌丝长满平皿后, 置于 365 nm 黑光灯下诱导产孢; α 型分生孢子大量出现时, 挑取分生孢子角, 用上述农杆菌菌液调节 α 型分生孢子浓度至 10^6 个/mL。

1.5 转化条件的优化与转化子的筛选

分别进行乙酰丁香酮 (AS) 浓度 (0, 100, 200, 300, 400 mol/mL)、共培养筛选时间 (24, 48, 72 h)、共培养温度 (20, 22, 25 °C) 对农杆菌转化效率影响的试验, 将含有不同浓度 AS 和 1.0 mg/mL MES 的 Co-IM 培养基上铺一层无菌玻璃纸, 吸取病菌分生孢子-农杆菌混合液涂布于玻璃纸上, 置于不同温度共培养; 取下玻璃纸转移至空培养皿中, 并覆盖含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素和 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻肟钠的 PDA 培养基, 25 °C 继续培养 2 ~ 5 d, 挑取单菌落接种至含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素的 PDA 平板上继续培养, 能在

该平板上继续生长的菌落初步推定为转化子。统计每 100 μL 樱桃干腐病菌分生孢子悬浮液转化产生的转化子数目,每处理重复 4 次。

1.6 樱桃干腐病菌转化子的鉴定

1.6.1 转化子的 PCR 检测 分别提取干腐病菌转化子和野生型菌株的基因组 DNA,利用潮霉素转移酶基因的特异引物 hphup (5'-AAAGCCTGAACTCACCGGACG-3') 和 hphdown (5'-CGGTTTCCACTATCGCGGAGTACTTCTAC-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 61 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

1.6.2 转化子的 Southern blot 鉴定 随机选取 3 个干腐病菌转化子,参照 Stewart 和 Laura 的方法^[13]提取基因组 DNA *Hind* III 单酶切后利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。以 1.6.1 中潮霉素基因的扩增产物为模板,探针标记和检测的方法按照试剂盒 (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit, Roche) 说明书进行,并参照说明书上提供的步骤进行 Southern 杂交检测 T-DNA 插入的拷贝数。

1.6.3 转化子的遗传稳定性分析 将上述 Southern 杂交检测有潮霉素基因插入的干腐病菌转化子,接种到不含潮霉素的 PDA 平板上,待菌落长满平皿后再转接到相同培养基上,连续培养 5 代后接种到含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素的 PDA 平板上,观察转化子是否仍对潮霉素表现出抗性,测定潮霉素基因在转化子基因组中的遗传稳定性,试验设 4 次重复。

2 结果与分析

2.1 抗生素对樱桃干腐病菌和农杆菌的影响

2.1.1 平板法测定不同浓度潮霉素对干腐病菌菌丝生长的影响 将活化后的樱桃干腐病菌 LXS230101 菌株接种到含有潮霉素浓度梯度为 0, 25, 50, 100, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PDA 培养基上,培养 7 d 后干腐病菌的生长情况见图 1。25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素对樱桃干腐病菌的生长有明显的抑制作用,但菌饼边缘仍可见少量菌丝生长;50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素可完全抑制病菌的生长,且在此条件下樱桃干腐病菌的 α 型分生孢子完全不能萌发。因此,本转化体系选择 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素筛选樱桃干腐病菌的阳性转化子。

2.1.2 平板法测定不同浓度头孢噻肟钠对农杆菌生长的影响 取 100 μL 农杆菌菌液涂布在含头孢噻肟钠浓度梯度为 0, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PDA 平板上,培养 3 d 后观察发现,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻肟钠对农杆菌的抑制效果不明显;在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻肟钠浓度下 3 d 后可以长出 10 ~ 15

个菌落;而当培养基中头孢噻肟钠浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,农杆菌的生长完全受到了抑制。因此,本研究用于抑制农杆菌生长的头孢噻肟钠浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

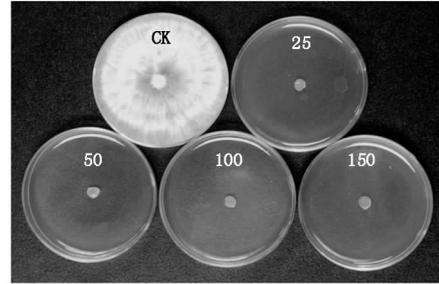


图1 不同浓度潮霉素对樱桃干腐病菌 LXS230101 的抑制作用
Fig.1 Inhibition of hygromycin with different concentrations on growth of *P. perniciosa* strain LXS230101

2.2 转化子的获得及初步鉴定

将根癌农杆菌-樱桃干腐病菌分生孢子混合液在诱导培养基上共培养 24 ~ 72 h 后,覆盖选择培养基继续培养 3 ~ 5 d 后陆续可以看到大量转化菌落出现,随机挑取这些潮霉素抗性的单菌落转接到新的含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素的选择培养基上,均可以正常生长。将这些转化子在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素的 PDA 培养基上连续转接 3 代后,转到 1.5 mL 离心管中置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

2.3 转化条件的优化

对 AS 浓度、共培养温度和共培养时间进行优化,结果发现 AS 浓度对樱桃干腐病菌转化效率有显著影响(图 2)。培养基中不添加 AS 时,仅得到极少量的转化子,添加 AS 后转化效率显著提高,当 AS 浓度为 200 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 时,转化效率最高,每 1×10^6 个 α 型分生孢子中可产生 686 个转化子,但随着 AS 浓度的继续增加,转化效率逐渐下降,添加 AS 浓度为 400 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 时,每 10^6 个 α 型分生孢子得到的转化子数不足 100 个。

研究发现,共培养温度(22, 25, 28 $^{\circ}\text{C}$)对樱桃干腐病菌转化效率的影响不明显,在 3 个温度条件下得到的转化子数目没有显著差异;在添加 AS 浓度为 200 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的情况下,共培养时间为 24 h 时,几乎没有转化子长出,随着共培养时间延长,转化子数目逐渐增多,共培养时间为 48, 72 h 时,每 1×10^6 个 α 型分生孢子中得到的转化子数目分别为 374, 686 个。因此,本研究筛选的樱桃干腐病菌最优转化体系为: α 型分生孢子浓度为 1×10^6 个/ mL ,培养基中添加 AS 浓度为 200 $\mu\text{mol}/\text{mL}$,共培养温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,共培养时间为 72 h。

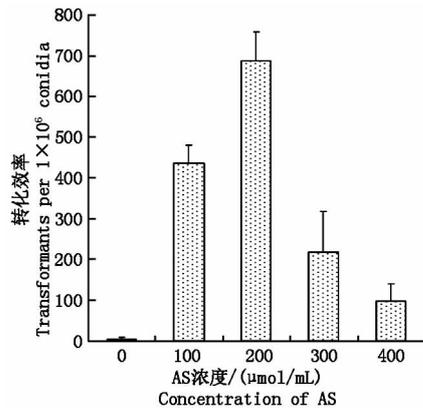
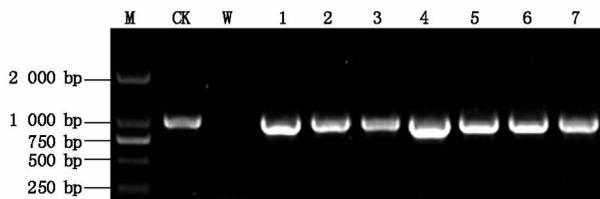


图2 乙酰丁香酮浓度对樱桃干腐病菌 LXS230101 转化效率的影响

Fig. 2 The effect of acetosyringone concentration on the transformation efficiency of *P. pernicioso* strain LXS230101

2.4 樱桃干腐病菌转化子的验证

2.4.1 转化子的 PCR 检测 随机挑取 7 个樱桃干腐病菌转化子,以基因组 DNA 为模板,利用潮霉素基因的特异引物 hphup 和 hphdown 进行 PCR 扩增,图 3 电泳检测结果显示,所有转化子和质粒阳性对照均可扩增到潮霉素基因的目标条带(987 bp),但在干腐病菌的野生型菌株中未扩增到任何条带,初步证明潮霉素转移酶基因成功整合到樱桃干腐病菌的基因组中,而在野生型菌株中不存在该基因的序列没有质粒的整合。



M. DNA 分子量标准 DL2000; CK. 质粒 pBIG3C; W. 野生型菌株 LXS230101; 1~7. 转化子 1~7。
M. DNA maker DL2000; CK. Plasmid pBIG3C; W. Wild-type strain LXS230101; 1~7. Transformants from 1 to 7.

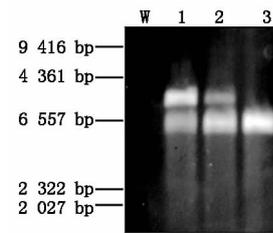
图3 樱桃干腐病菌部分转化子的 PCR 检测结果

Fig. 3 PCR detection results of partial transformants of *P. pernicioso* strain LXS230101

2.4.2 转化子的 Southern blot 分析 对樱桃干腐病菌的转化子进行 Southern blot 检测,图 4 结果显示,樱桃干腐病菌野生型菌株与潮霉素转移酶基因的片段未能杂交到任何条带;但 3 个转化子均能检测到特异性杂交条带,其中 2 个转化子为双拷贝插入,1 个转化子为单拷贝插入。由此证明,潮霉素转移酶基因已成功整合到樱桃干腐病菌的基因组中。

2.4.3 转化子的遗传稳定性测定 将 Southern blot 检测的上述 3 个转化子,接种在不含潮霉素的 PDA 培养基上连续培养 5 代,再转接到含潮霉素的 PDA 平板上,结果表明,所有的转化子仍表现出对潮霉素的抗性,该结果进一步证实 T-DNA 已插入到樱桃干

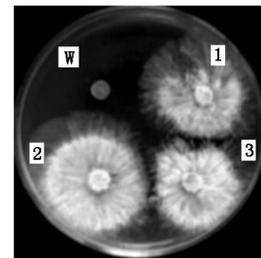
腐病菌基因组中并能随着菌丝的有丝分裂稳定遗传(图 5)。



W. 野生型菌株 LXS230101; 1~3. 转化子 1~3。
W. Wild-type strain LXS230101; 1~3. Transformants from 1 to 3.

图4 樱桃干腐病菌转化子的 Southern blot 分析

Fig. 4 Southern blot analysis of partial transformants of *P. pernicioso* strain LXS230101



W. 野生型菌株 LXS230101; 1. 转化子 1; 2. 转化子 2; 3. 转化子 3。
W. Wild-type strain LXS230101; 1. Transformant 1; 2. Transformant 2; 3. Transformants 3.

图5 樱桃干腐病菌转化子的遗传稳定性

Fig. 5 Genetic stability of partial transformants of *P. pernicioso* strain LXS230101

3 讨论

拟茎点霉属真菌可产生 α 型和 β 型 2 种类型的分生孢子, β 型分生孢子的性状是该属真菌鉴定的重要依据之一,但 β 型分生孢子不能萌发不具有致病性^[14]。对樱桃干腐病菌诱导产孢时,在 PDA 培养基上首先出现的是 β 型分生孢子,当发现有大量孢子从孢子角溢出时,尚不能立刻进行遗传转化试验,待显微镜下观察到有大量 α 型分生孢子出现时,依据 α 型分生孢子浓度制备孢子悬浮液。本研究发现,樱桃干腐病菌在 PDA 培养基上开始产生分生孢子后,再继续诱导 7 d 即可得到满足转化试验要求的 α 型分生孢子。

农杆菌介导的遗传转化技术因其简便、高效及外源基因易于整合等优点,在真菌的遗传转化中得到了广泛的应用,为真菌的功能基因研究提供了强有力的工具。相比传统的 PEG 介导的原生质体转化、限制酶介导的整合(REMI)技术等真菌转化方法,农杆菌介导的转化克服了众多的缺点,比如 PEG 介导的转化需要繁琐的制备原生质体的步骤,且转化效率较低;REMI 技术则容易导致比例较高的非质粒插入或含多拷贝质粒整合突变体,导致得

到的突变体不容易分析^[15-19]。本研究选用双元载体 pBIG3C 和农杆菌 EHA105 菌株,利用农杆菌介导的转化技术首次对樱桃干腐病菌实现了成功转化。为提高转化效率,对转化中的共培养温度、AS 浓度及共培养时间进行了优化,研究发现共培养阶段添加 AS 的浓度对转化效率有显著影响,在不添加 AS 的情况下,几乎没有转化子长出,随着 AS 浓度的增加转化效率显著提高,但 AS 浓度大于 200 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 时转化效率又随着 AS 浓度的增加而下降,表明樱桃干腐病菌转化中共培养阶段需要 AS 的诱导,而高浓度的 AS 可能对病菌产生了毒害,抑制了其分生孢子的萌发。

本研究对筛选到的樱桃干腐病菌转化子进行了 PCR 检测和 Southern blot 分析,进一步证实 T-DNA 已整合进干腐病菌基因组中,且外源基因能在转化子中稳定遗传,该转化体系为干腐病菌功能基因的研究提供了有效的技术手段。在后续工作中,将构建大容量的樱桃干腐病菌转化子库,对转化子的表型、生物学特性和致病性等进行系统分析,以此为基础筛选出樱桃干腐病菌致病性和生长发育缺陷型,进而克隆相关基因明确其在病原菌致病性及生长发育中的作用,为全面揭示该病菌的致病机理奠定基础。

参考文献:

[1] 张正国. 大樱桃枝干病虫害及防治技术 [J]. 中国果蔬, 2007, 3: 30.

[2] Wang C X, Li B H, Dong X L, et al. First report of stem canker on cherry caused by *Phomopsis perniciosa* in Shandong Peninsula, eastern China [J]. Plant Disease, 2011, 95: 1316.

[3] 戚佩坤, 姜子德, 向梅梅. 中国真菌志: 拟茎点霉属 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.

[4] Uddin W, Stevenson K L, Pardo-Schultheiss R A, et al. Pathogenic and molecular characterization of three *phomopsis* isolates from peach, plum, and asian pear [J]. Plant Disease, 1998, 82(7): 732-737.

[5] Eugénio L F D, Jorge M S, Alan J L P. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *diaporthe* and *phomopsis* species on almond in Portugal [J]. Fungal Diversity, 2010, 44: 107-115.

[6] Mullins E D, Chen X, Romaine P, et al. Agrobacterium mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer [J]. Phytopathology, 2001, 91(2): 173-180.

[7] Yang Y J, Lee I. Agrobacterium tumefaciens-mediated

transformation of *Monascus ruber* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(4): 754-758.

[8] Zheng Z L, Huang C H, Cao L, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in medicinal fungus *Cordyceps militaris* [J]. Fungal Biology, 2011, 115: 265-274.

[9] De Groot M J A, Bundock P, Hooykass P J J, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi [J]. Nature Biotechnology, 1998, 16: 839-842.

[10] 吴毅歆, 范成明, 周惠萍, 等. 一种农杆菌介导稻瘟病菌的遗传转化 [J]. 植物保护学报, 2008, 35(5): 421-426.

[11] 曾大兴, 李敏慧, 姜子德. 根癌农杆菌介导的香蕉炭疽菌转化 [J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18(4): 42-44.

[12] 王梅娟, 李坡, 吴敏, 等. 玉米大斑病菌 ATMT 突变体库的构建及其分析 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(12): 2384-2392.

[13] Stewart C N J, Laura E V. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications [J]. Bio Techniques, 1993, 14(5): 748-751.

[14] 罗利娟, 习平根, 姜子德, 等. 纯培养下拟茎点霉分生孢子的形成及意义 [J]. 菌物学报, 2004, 23(3): 375-380.

[15] Amey R, Athey-Pollard A, Bums C, et al. PEG-mediated and Agrobacterium-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola* [J]. Mycological Research, 2002, 106(1): 4-11.

[16] Rogers C W, Challen M P, Green J R, et al. Use of REMI and Agrobacterium-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus *Coniothyrium minitans* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 241(2): 207-214.

[17] 贾培松, 丁丽丽, 周邦军, 等. 棉花黄萎病菌 T-DNA 插入突变体库的构建及其表型分析 [J]. 棉花学报, 2012, 24(1): 62-70.

[18] Kimura A, Takano Y, Furusawa I, et al. Peroxisomal metabolic function is required for appressorium-mediated plant infection by *Colletotrichum lagenarium* [J]. Plant Cell, 2001, 13: 1945-1957.

[19] Chen X L, Yang J, Peng Y L. Large-scale insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae* by Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation [J]. Fungal Genomics Methods in Molecular Biology, 2011, 722: 213-224.