

杜 艳, 刘永锋, 常有宏, 等. 梨炭疽病菌原生质体遗传转化体系的建立及 *GFP* 标记菌株的获得[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 295-300.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.009

梨炭疽病菌原生质体遗传转化体系的建立及 *GFP* 标记菌株的获得

杜 艳¹, 刘永锋¹, 常有宏², 蔺 经², 乔俊卿¹, 刘邰洲¹

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014; 2. 江苏省农业科学院园艺研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为建立梨炭疽病菌的原生质体遗传转化体系, 以梨炭疽病菌菌株 II-17 为供试菌株, 研究了菌龄、酶解液组合及酶解时间等对梨炭疽病菌原生质体制备的影响。结果表明, 制备梨炭疽病菌原生质体的适宜条件为: CM 液体培养基培养分生孢子 24 h 后, 再转接到新的 CM 液体培养基中培养 24 h, 获得新鲜的菌丝; 最适酶解液组合为 9.0 mg/ml 裂解酶+1.0 mg/ml 崩溃酶+1.0 mg/ml 蜗牛酶; 酶解时间为 2.5~3.0 h 时酶解效率最高。对获得的转化子进行 PCR 鉴定和荧光观察, 结果表明, *GFP* 标记基因已成功整合到梨炭疽病菌的基因组中, 转化子发出强烈的绿色荧光且遗传性稳定。致病性测定结果表明, 转化子致病性与野生型菌株无明显差别, 成功获得了梨炭疽病菌的 *GFP* 标记菌株。

关键词: 梨炭疽病菌; 遗传转化; 原生质体; *GFP* 标记菌株

中图分类号: S661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0295-06

Establishment of genetic transformation system of *Colletotrichum gloeosporioides* protoplast and generation of *GFP*-tagged transformants

DU Yan¹, LIU Yong-feng¹, CHANG You-hong², LIN Jing², QIAO Jun-qing¹, LIU You-zhou¹

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To establish PEG-mediated genetic transformation of *Colletotrichum gloeosporioides*, single spore isolate II-17 of *Colletotrichum gloeosporioides* was used as a material of genetic transformation, culture time, enzyme mixtures and digestion time was studied in this study. The result showed that mycelia was cultured in CM liquid medium for 24 h, and then transferred to new CM liquid medium for 24 h, which was suitable for protoplast generation. The enzyme mixture was 9.0 mg/ml lysing enzyme, 1.0 mg/ml driselase and 1.0 mg/ml snailase. In addition, when the enzymolysis time ranged from 2.5 h to 3.0 h, the efficiency was the highest. PCR and fluorescence observation results showed that the fluorescence gene *GFP* had been successfully integrated into the genome of the II-17 strain, and the heredity of transformants was steady. The pathogenicity test indicated that there was no significant difference between *GFP* transformants and the wild type strain, and the *GFP*-tagged transformants of *Colletotrichum gloeosporioides* were successfully generated.

Key words: *Colletotrichum gloeosporioides*; genetic transformation; protoplast; *GFP*-tagged transformants

收稿日期: 2016-04-27

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(15)1023]

作者简介: 杜 艳 (1984-), 女, 安徽阜阳人, 博士, 助理研究员, 主要从事植物真菌病害研究。(Tel) 13951738556; (E-mail) dy411246508@126.com。

通讯作者: 刘邰洲, (Tel) 025-84390228; (E-mail) shitouren88888@163.com

梨炭疽病是梨树上的一种重要真菌病害, 给中国农业生产造成严重的经济损失。梨炭疽病又称苦腐病、晚腐病, 主要为害果实, 也能侵染枝干和叶片等。自 2003 年以来, 梨炭疽病在中国黄河

故道梨产区都有不同程度的发生,尤其对砀山酥梨危害明显。2008 年砀山地区暴发梨炭疽病,病果率达到 70% 以上,直接经济损失超过 7×10^8 元,果农损失惨重^[1-2]。

梨炭疽病是由胶孢炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 引起的一种真菌病害,其有性世代为围小丛壳 (*Glomerella cingulata*)^[3]。该病害一般以菌丝体和分生孢子在病组织上越冬,分生孢子可以通过风雨或者昆虫传播,当温湿度条件适宜时,分生孢子萌发直接或者经皮孔、伤口等侵入寄主果实或者叶片,最终导致植物发病^[4]。由于炭疽病菌种类繁多,同属不同种炭疽病菌在生物学特性、遗传多态性及致病机理等方面存在较大差异。目前,国内对梨炭疽病菌的研究多集中在病原菌鉴定^[5-6]、生物学特性^[7]、药剂筛选^[8-9]等方面,至今鲜有对梨胶孢炭疽病菌致病机理的报道,这在一定程度上限制了对其侵染和致病机制的深入认识。

遗传转化是研究其生长发育与致病过程分子机制的基本工具。目前已有多种遗传转化技术在植物炭疽病菌研究中得到应用,包括 CaCl_2/PEG 介导的原生质体转化法^[10-11]、根癌农杆菌介导方法 (AT-MT)^[12-13]、电穿孔转化法^[14]等。其中, CaCl_2/PEG 介导的原生质体转化法是一种传统的遗传转化方法。在植物病原炭疽病菌中,原生质体的数量和质量在炭疽病菌原生质体的转化过程中至关重要,直接影响转化效率^[14-15]。首先,原生质体的数量和质量与菌龄、酶解液的组分及酶解时间等因素密切相关,其次,转化质粒与所用载体 (包括启动子、报告基因和所含的抗性标记等) 密切相关。因此,建立一套高效、稳定的梨胶孢炭疽病菌遗传转化体系,对梨胶孢炭疽病菌进行以分子生物学为手段的功能基因组学研究,有助于更好地了解寄主-病原物互作的分子机制。

本研究探索梨胶孢炭疽病菌原生质体遗传转化的条件,拟构建该病原菌的遗传转化体系,并获得带有绿色荧光标记的转化子,为下一步研究梨炭疽病菌的基因功能以及追踪梨炭疽病菌的侵染与定殖过程奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株及质粒 梨炭疽病菌菌株 II-17 分离自

江苏省丰县大沙河砀山酥梨果园的病叶、病果,经单孢分离后保存。含博莱霉素抗性的质粒 pYF11 由南京农业大学真菌实验室馈赠,经改造后备用。

1.1.2 培养基 PSA 培养基:取马铃薯 200 g 洗净去皮后切成小块,加水煮烂,用四层纱布过滤,向滤液中加入 20 g 蔗糖,补 ddH_2O 至 1 L,加入琼脂粉 15 g, 121°C 高压蒸汽灭菌 20 min。

CM 培养基 (Complete medium): $20 \times \text{Nitrate salts}$ 20 ml, Vitamin solution 1 ml, Trace elements 1 ml, D-Glucose 10 g, 加 ddH_2O 定容至 1 000 ml。其中, $20 \times \text{Nitrate salts}$ 配方为: NaNO_3 120.0 g, KCl 10.4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.4 g, KH_2PO_4 30.4 g, 加 ddH_2O 定容至 1 000 ml; Vitamin solution 配方为: Biotin 0.01 g, Pyridoxin 0.01 g, Thiamine 0.01 g, Riboflavin 0.01 g, PABA 0.01 g, Nicotinic acid 0.01 g, 加 ddH_2O 定容至 1 000 ml。

TB3 培养基:酵母提取物 (Yeast extract) 3.0 g, 酸水解酪蛋白 (Casamino acids) 3.0 g, 蔗糖 (Sucrose) 200.0 g, 加 ddH_2O 定容至 1 000 ml。

1.1.3 试剂 裂解酶 (Lysing enzyme)、崩溃酶 (Driselase) 和聚乙二醇 (PEG) 购自美国 Sigma-aldrich 公司,蜗牛酶 (Snailase) 购自索莱宝 Solarbio 公司;博莱霉素 (Bleomycin) 购自 Invitrogen 公司。

STC 缓冲液:蔗糖 50 g, 0.5 mol/L Tris-HCl ($\text{pH}=8.0$) 25 ml, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.838 g, 加 ddH_2O 定容至 250 ml。

PTC 缓冲液:称量 PEG4000 60 g, 溶解于 STC 缓冲液中,定容至 100 ml, 65°C 水浴锅加热完全溶解后,用 0.22 μm 细菌过滤器过滤除菌。

酶解液配制:称取细胞壁破壁酶后,用 0.7 mol/L NaCl 溶解完全后定容至 5 ml,用 0.22 μm 细菌过滤器过滤除菌。

1.1.4 引物 根据 GFP 基因编码区的序列,设计 1 对特异性引物 (GFPF: 5'-AACGGCCACAAGT-TCAGCGTGT-3'; GFPR: 5'-ATGTGATCGCGCT-TCTCGTT-3'),引物由上海英俊公司合成。

1.2 梨炭疽病菌对博莱霉素的敏感性测定

将梨胶孢炭疽病菌菌株 II-17 接种在 PSA 培养基培养 5 d 后,沿菌落边缘用直径为 5 mm 的打孔器打取菌丝块,转接到博莱霉素浓度分别为 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PSA 培养基上,置于 26°C 培养箱中生长 7

d,观察生长情况并测量菌落大小,试验设3次重复。

1.3 梨炭疽病菌的遗传转化

1.3.1 原生质体的制备 将0.25 g菌丝置于盛有5 ml酶解液的10 ml离心管中酶解,离心管平放,30℃,60 r/min振荡酶解2 h,用双层Miracloth(Calbiochem, USA)过滤收集原生质体于离心管中,冷冻离心机3 000 r/min、4℃下离心10 min,弃上清液,加1 ml STC悬浮,3 000 r/min、4℃离心5 min,收集原生质体,去上清液,加入STC悬浮原生质体,光学显微镜下镜检原生质体。用STC缓冲液调节原生质体终浓度达到每1 ml 10^8 个,然后将原生质体分装为每管200 μ l,备用。

1.3.2 不同试验设置对原生质体的影响 菌龄:(1)切取胶孢炭疽病菌菌丝块于CM液体中26℃摇动培养2 d,150 r/min振荡培养24 h,观察菌丝生长情况;(2)待菌丝长满平皿后,用接种环划伤菌丝,继续培养1周后收集孢子,然后将其转接到CM液体培养基中,26℃、150 r/min振荡培养48 h,收集菌丝;方法同(2)收集孢子培养24 h,至新鲜菌丝产生,然后将摇动培养的菌丝转接到新的CM液体培养基中26℃振荡培养,24 h后过滤收集菌丝。

细胞壁酶:不同酶组合如下:(1)9.0 mg/ml裂解酶;(2)9.0 mg/ml裂解酶+1.0 mg/ml蜗牛酶;(3)2.5 mg/ml崩溃酶;(4)9.0 mg/ml裂解酶+1.0 mg/ml崩溃酶;(5)1.0 mg/ml崩溃酶+1.0 mg/ml蜗牛酶;(6)9.0 mg/ml裂解酶+1.0 mg/ml崩溃酶+1.0 mg/ml蜗牛酶

酶解时间:将新鲜菌丝体在细胞壁酶的作用下,30℃酶解4.0 h,每隔0.5 h观察原生质体的生成情况。

1.3.3 遗传转化 将2 μ g pYF11质粒DNA加于200 μ l梨胶孢炭疽病菌的原生质体中,轻轻混匀,室温静置25 min,分2~3次加1 ml PTC缓冲液,轻轻混匀,室温静置25 min,将梨胶孢炭疽病菌原生质体加到10 ml含200 μ g/ml博莱霉素的TB3固体培养基中,轻轻混匀后倒入培养皿中,然后置于26℃,黑暗培养24 h,往培养皿中再倒入10 ml含400 μ g/ml博莱霉素的TB3固体培养基,26℃下黑暗培养7~10 d至长出转化子,挑取转化子到含有400 μ g/ml博莱霉素的PSA平板上,26℃黑暗培养,再连续培养3代,筛选获得性状稳定的转化子。

1.3.4 转化子的PCR鉴定 从PSA培养基上生长5 d的菌落边缘刮取菌丝,以CTAB法快速提取野生型和转化子的基因组DNA作为模板,分别用GFP特异性引物GFPF:5'-AACGGCCACAAGTTCAGCGTGT-3'和GFPR:5'-ATGTGATCGCGCTTCTCGTT-3'进行PCR扩增。PCR反应体系为:模板0.50 μ l,10×Taq Buffer(含 Mg^{2+})2.50 μ l,上下游引物(20 μ mol/L)各0.25 μ l,2.5 mmol/L dNTP Mix 2.50 μ l, Taq DNA polymerase 0.25 μ l,补ddH₂O至25.00 μ l。PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸30 s,32个循环;72℃延伸10 min,4℃保温。PCR扩增后产物经过1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 转化子的GFP荧光观察

将PCR检测到的GFP片段的转化子菌丝和孢子分别制成临时玻片,用Nikon荧光显微镜观察,转化成功的转化子发出强的绿色荧光。

1.5 致病性测定

参照刘邈洲等^[7]的方法,将野生型菌株和转化子接在PSA平板上培养5 d后,从菌落边缘用打孔器(直径为7 mm)打孔,将菌丝块接种到砀山酥梨表面刺伤的部位(赤道处),26℃培养5 d,观察发病情况,试验设3次重复。

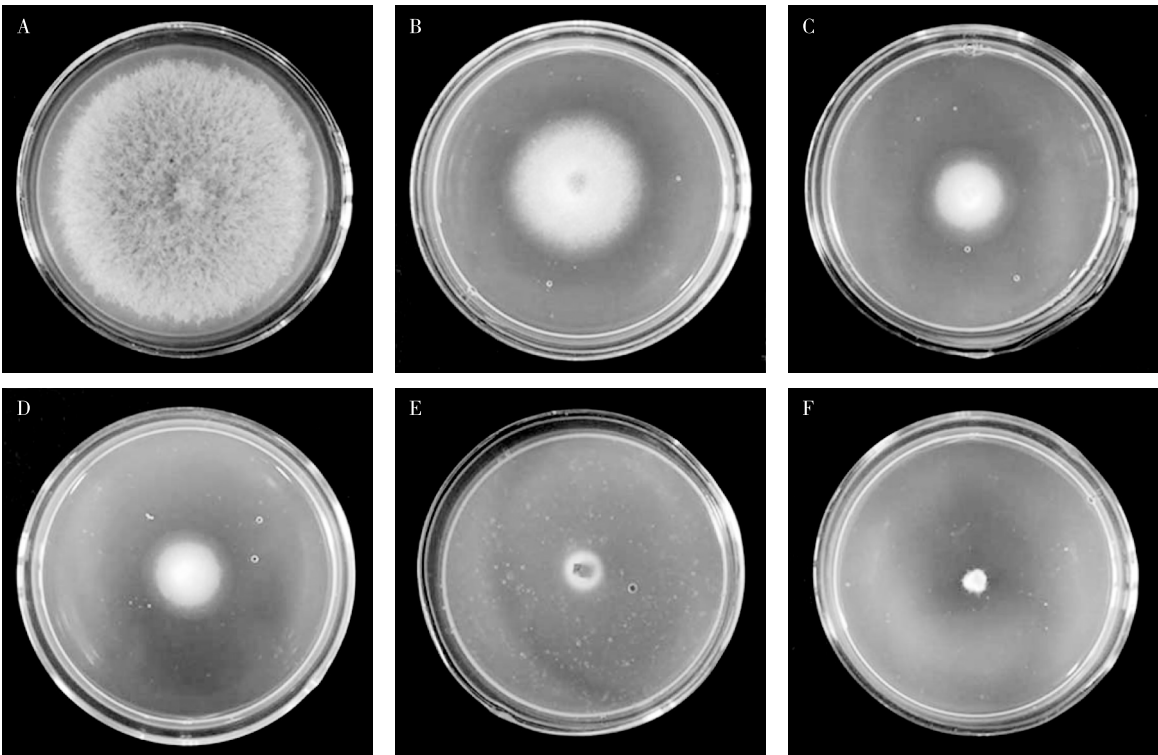
2 结果与分析

2.1 梨胶孢炭疽病菌对博莱霉素的抗性

将培养5 d的梨胶孢炭疽病菌菌株II-17接种于含不同博莱霉素浓度(0 μ g/ml、100 μ g/ml、200 μ g/ml、300 μ g/ml、350 μ g/ml和400 μ g/ml)的PSA培养基上,置于26℃培养7 d,菌落平均直径分别为5.33 cm、3.47 cm、2.63 cm、1.97 cm、1.13 cm和0.30 cm(图1)。结果表明,浓度为100~400 μ g/ml的博莱霉素对梨炭疽病菌的生长有不同程度的抑制,尤其在400 μ g/ml博莱霉素条件下,炭疽病菌的生长完全受到抑制。因此,选择400 μ g/ml博莱霉素作为筛选转化子的浓度。

2.2 不同因素对原生质体产量的影响

2.2.1 菌龄对原生质体产量的影响 当梨炭疽病菌的分生孢子在CM液体培养基生长至24 h后,继续转接到新的CM液体培养基中扩培24 h,此时的新鲜菌丝产生的原生质体数量最多,最适合原生质体转化。若将菌丝块摇动培养48 h,或者直接孢子



A~F 表示博莱霉素浓度依次为 0 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 、300 $\mu\text{g/ml}$ 、350 $\mu\text{g/ml}$ 、400 $\mu\text{g/ml}$ 。
图 1 梨炭疽病菌对博莱霉素的敏感性
Fig.1 Sensitivity of *C. gloeosporioides* II-17 to bleomycin

摇动培养 48 h,产生菌丝体的时间较长,影响酶的作用时间,影响原生质体的产量。

2.2.2 细胞壁酶对原生质体产量的影响 当崩溃酶的浓度达到 2.5 mg/ml时,原生质体的产量虽然较多,但是其形态发生了明显的改变;当崩溃酶的浓度降低至 1.0 mg/ml时,原生质体的形态正常,适合作为转化浓度。进一步通过酶的单个或者组合处理,发现梨炭疽病菌的原生质体都有不同程度的释放,其中酶组合处理效率远大于单种酶的效率,尤其是当 9.0 mg/ml裂解酶、1.0 mg/ml崩溃酶和 1.0 mg/ml蜗牛酶 3 种酶共同作用时,释放的原生质体量最高,达到 1 ml 12.5×10^6 个(表 1)。

2.2.3 酶解时间对原生质体产量的影响 随着酶解时间的延长,原生质体逐渐被释放出来,原生质体的数量也在不断增加。当酶解时间为 2.5 h 时,原生质体的数量最高,达到 1 ml 1.0×10^8 个,继续增加至 3.0 h 时,原生质体的数量与 2.5 h 差异不明显,但是当酶解时间继续增加至 4.0 h 时,原生质体的生成量反而下降,这可能与细胞壁酶的酶解效率有关。因此,最佳的酶解时间为 2.5~3.0 h。

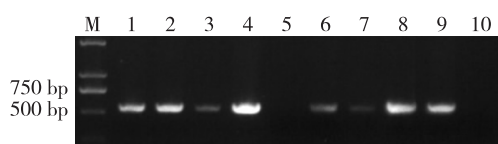
表 1 不同酶处理对原生质体产量的影响
Table 1 Influence of different enzyme treatments on the protoplast yield of *Colletotrichum gloeosporioides*

酶处理	1 ml 原生质体个数($\times10^6$ 个)
9.0 mg/ml裂解酶	7.9 \pm 0.09c
9.0 mg/ml裂解酶+1.0 mg/ml蜗牛酶	8.1 \pm 0.08c
2.5 mg/ml崩溃酶	7.7 \pm 0.12c
9.0 mg/ml裂解酶+1.0 mg/ml崩溃酶	10.9 \pm 0.94b
1.0 mg/ml崩溃酶+1.0 mg/ml蜗牛酶	6.4 \pm 0.26c
9.0 mg/ml裂解酶+1.0 mg/ml崩溃酶+1.0 mg/ml蜗牛酶	12.5 \pm 0.41a

不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.3 梨胶孢炭疽病菌转化子的 PCR 鉴定

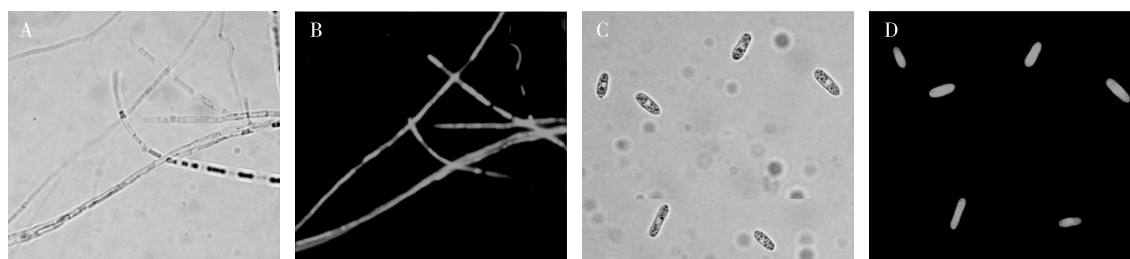
随机挑取 10 个转化子的基因组 DNA 和野生型基因组 DNA 作为模板,以 GFPF 和 GFPR 为引物进行 PCR 扩增,扩增产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳检测。结果(图 2)表明,转化子均扩增到绿色荧光蛋白基因的部分片段,大小约为 600 bp,与预期片段大小一致,而未转化 GFP 的野生型菌株作为阴性对照,未能扩增出目的条带,说明 GFP 标记基因已经成功转化到梨炭疽病菌的基因组中。



M: Marker; 1~9: 获得的转化子; 10: 未转化的野生型菌株。

图2 梨炭疽病菌转化子的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR identification of *C. gloeosporioides* transformants



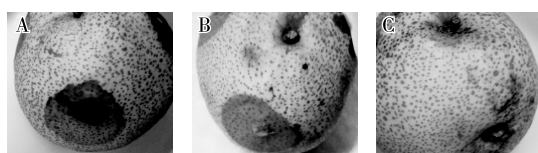
A 和 C: 白光条件下的菌丝和孢子; B 和 D: 荧光条件下的菌丝和孢子。

图3 梨炭疽病菌转化子的绿色荧光显微观察

Fig.3 Fluorescence observation of *C. gloeosporioides* transformants

2.5 荧光菌株的致病性

采用菌丝块打孔的方法对砀山酥梨进行致病性测定,接种 6 d 后调查致病情况。结果(图 4)表明,转化菌株及野生型菌株接种砀山梨后均出现同心轮纹状的病斑,而未接种病原菌的对照未发病。



A: 野生型菌株 II-17; B: GFP 转化菌株; C: 对照。

图4 转化菌株的致病性测定

Fig.4 Pathogenicity test of *C. gloeosporioides* transformants

3 讨论

目前,已有多种遗传转化技术在植物炭疽病菌研究中得到应用,其中包括 CaCl_2/PEG 介导的原生质体转化法、根癌农杆菌介导的转化法(ATMT)、电穿孔转化法等。ATMT 虽操作简便,但转化时间长,工作量大,适用于突变体库的构建^[16-17];电穿孔转化法转化效率低,目前极少在真菌转化中应用^[18-19]; CaCl_2/PEG 是目前较为传统的转化方法,其操作步骤简便,可用于目的基因的敲除和替换,已成为获得转

2.4 转化子的荧光观察及遗传稳定性

挑取 PCR 检测为阳性的转化子的菌丝和孢子制成临时玻片,用 Nikon 荧光显微镜观察发现转化成功的菌丝和孢子能发出较强的绿色荧光(图 3)。转化子经过博来霉素抗性选择继代培养 3 代后,仍能观察到较强的绿色荧光,且菌丝和分生孢子的生长发育没有发生变化,表明其具有较高的遗传稳定性。

化子的最普遍的转化技术^[20-21]。由于炭疽病菌种类繁多,同属不同种炭疽病菌在遗传转化条件方面存在较大差异。因此,本研究通过摸索梨炭疽病菌的转化条件,采用 CaCl_2/PEG 介导的方法建立遗传转化体系,便于后续梨炭疽病菌致病相关基因的功能研究。

自 1973 年 Mishra 和 Tatum 首次报道真菌 *Neurospora crassa* 的遗传转化以来,许多真菌都建立了高效的遗传转化体系,该方法在其他病原真菌原生质体转化体系的建立中不断推广^[22]。原生质体的数量和转化质粒在胶孢炭疽病菌的转化过程中至关重要,直接影响该病原菌的转化效率。首先,原生质体的数量与菌龄、菌量、酶解液的组分及酶解时间等因素密切相关。本研究结果表明,梨炭疽病菌的分生孢子经 CM 液体培养基培养 24 h 后,再继续在新的 CM 液体培养基中培养 24 h,此时获得的菌丝最为新鲜,获得的原生质体最适于转化,此方法暂未有人报道。李思蒙等^[11]报道直接将收集的孢子在 TB_3 培养基中摇动培养后收集菌丝,作者发现这种方法并不适合梨炭疽病菌原生质体的转化,这可能与不同炭疽病菌对培养基营养物质的利用不同相关。丝状真菌的细胞壁成分复杂,主要成分是多糖,也包含纤维素、葡聚糖等成分^[23]。本试验结果表明,仅用单一酶去降解细胞壁效果不理想。虽然崩溃酶降解效果比较明显,但是

原生质体的形态发生了改变。而当裂解酶、崩溃酶和蜗牛酶3种酶组合,原生质体的数量明显高于其他处理。此外,酶解时间对于原生质体的数量亦非常重要。研究结果表明,当酶解2.5~3.0 h时,原生质体释放最多,更易提高转化效率。

其次,转化质粒与所用载体(包括启动子、报告基因和所含的抗性标记等)密切相关。*GFP*作为一种广泛的报告基因,目前已被广泛用于各研究领域,尤其是在病原菌检测、基因表达、侵染与定殖等方面^[24]。本研究所用的转化载体具有增强型绿色荧光蛋白*GFP*基因以及真菌中的强启动子*RP27*,有效提高了转化菌株的荧光强度。转化载体含的抗性标记博莱霉素Ble,是一种常用的筛选标记。试验结果表明:博莱霉素在浓度100~400 µg/ml时对梨炭疽病菌的生长都有不同程度的抑制,尤其在400 µg/ml博莱霉素条件下,梨炭疽病菌完全受到抑制。因此,建议选择400 µg/ml博莱霉素作为筛选转化子的浓度。进一步研究发现*GFP*标记菌株与野生型菌株在生长及致病性方面无明显差异,该*GFP*标记菌株可作为后续研究的材料。

本研究利用PEG介导的遗传转化方法,在国内首次建立了梨炭疽病菌的遗传转化体系,并获得了稳定表达绿色荧光的转化子。该体系的建立为探索梨炭疽病菌致病相关基因的功能奠定基础,为后续追踪梨炭疽病菌的侵染与定殖过程,最终为研究梨炭疽病菌与梨相互作用的分子机制奠定基础。

参考文献:

- [1] 吴良庆,朱立武,衡伟,等. 砀山梨炭疽病原鉴定及其抑菌剂筛选[J]. 中国农业科学, 2010, 43(18): 3750-3758.
- [2] 沈静霆. 砀山酥梨炭疽病菌生物学特性及有效药剂筛选[D]. 合肥:安徽农业大学, 2012.
- [3] SHEAR C L, WOOD A K. Ascogenous forms of *Gloeosporium* and *Colletotrichum* [J]. Botanical Gazette, 1907, 43(4): 259-266.
- [4] 高正辉,张金云,伊兴凯,等. 砀山酥梨炭疽病发生特征与防治技术[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(19): 10445-10446.
- [5] 张磊,常有宏,刘邰洲,等. 梨轮纹病和炭疽病病原菌PCR检测[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(2): 415-420.
- [6] IVIC D, VONCINA D, SEVER Z, et al. Identification of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple and pear in Croatia [J]. Journal of Phytopathology, 2013, 161(4): 284-286.
- [7] 刘邰洲,陈志谊,钱国良,等. 梨胶胞炭疽病菌的分离、鉴定及其生物学特性[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(1): 60-64.
- [8] 刘邰洲,陈志谊,刘永锋,等. 枯草芽孢杆菌sf628对梨炭疽病的控制作用[J]. 植物保护学报, 2012, 39(6): 492-496.
- [9] 付余波,钱国良,胡白石,等. 21种杀菌剂对梨炭疽病菌、轮纹病菌、黑斑病菌的室内毒力测定[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(2): 178-180.
- [10] RODRIGUEZ R J, YODER O C. Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*) [J]. Gene, 1987, 54(1): 73-81.
- [11] 李思蒙,王永林,黄冬辉,等. 杨树炭疽病菌原生质体遗传转化的建立及绿色荧光蛋白的表达[J]. 林业科学, 2013, 49(5): 121-127.
- [12] 林春花,刘先宝,蔡吉苗,等. 橡胶树尖孢炭疽菌绿色荧光蛋白(*GFP*)标记转化株的获得[J]. 热带作物学报, 2009, 30(10): 1495-1500.
- [13] LIN C H, CAI Z Y, SHI T, et al. The use of T-DNA tagging to isolate mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* with reduced virulence against *Hevea brasiliensis* [J]. Forest Pathology, 2013, 43(4): 289-296.
- [14] ARMESTO C, MAIA F G M, ABREU M S D, et al. Genetic transformation with the *gfp* gene of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from coffee with blister spot [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2012, 43(3): 1222-1229.
- [15] 张俊,吕延超,刘晓妹,等. 芒果尖孢炭疽病原菌的绿色荧光蛋白基因标记[J]. 热带作物学报, 2011, 32(9): 1708-1710.
- [16] 刘朋娟,王政逸,王秋华,等. 农杆菌介导的稻瘟病菌转化及致病缺陷突变体筛选[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(3): 231-237.
- [17] 王海艳,李保华,张清明,等. 农杆菌介导苹果炭疽病菌的遗传转化及转化子鉴定[J]. 中国农业科学, 2013, 46(9): 1799-1807.
- [18] ROBINSON M, SHARON A. Transformation of the bioherbicide *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* by electroporation of germinated conidia [J]. Current Genetics, 1999, 36(1/2): 98-104.
- [19] 李伟. 芒果胶胞炭疽病菌遗传转化体系的建立[D]. 儋州:海南热带农业大学, 2004.
- [20] YELTON M M, HAMER J E, TIMBERLAKE W E. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984, 81(5): 1470-1474.
- [21] 张岳平,罗绍春,黄燕萍,等. 芦笋茎枯病菌原生质体的制备及再生[J]. 植物保护学报, 2014, 41(2): 182-186.
- [22] 周礼红,李国琴,王正祥,等. 红曲霉原生质体的制备、再生及其遗传转化系统[J]. 遗传, 2005, 27(3): 423-428.
- [23] 姚婷婷,王正祥. 黑曲霉原生质体的制备、再生及转化条件[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(4): 116-120.
- [24] 徐莹,刘太国,何月秋,等. 绿色荧光蛋白及其在丝状真菌研究中的应用[J]. 植物保护, 2008, 34(6): 1-6.

(责任编辑:陈海霞)