

农杆菌介导的小孢拟盘多毛孢遗传转化及突变体筛选

邓蕾 冯丹丹 汪祖鹏 潘慧 钟彩虹[✉] 李黎[✉]

中国科学院植物种质创新与特色农业重点实验室 中国科学院猕猴桃产业技术工程实验室 中国科学院种子创新研究院 中国科学院武汉植物园 湖北 武汉 430074

摘要: 本研究通过农杆菌 EHA105 介导的方法, 以含潮霉素抗性基因和 GFP 基因的双元载体 pCAMBgfp 为转化载体, 对小孢拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis microspora* KFRD-2 菌株进行遗传转化。基于潮霉素及 GFP 荧光抗性进行转化子的初步筛选, 随后, 进一步对转化子的菌落特征、菌丝生长速率、产孢量、荧光稳定性及致病力进行验证。结果获得阳性转化子 100 余株, 转化效率达 200 个转化子/ 10^6 个孢子。大部分转化子与野生型菌株无明显形态及致病力差异。同时, 获得了 14 株菌丝形态、产孢量或致病力与野生型存在明显差异的突变株, 可用于小孢拟盘多毛孢关键致病基因的挖掘验证及致病机理等研究。

关键词: 绿色荧光蛋白 (GFP), 转化子, 转化效率, 致病力

[引用本文] 邓蕾, 冯丹丹, 汪祖鹏, 潘慧, 钟彩虹, 李黎, 2021. 农杆菌介导的小孢拟盘多毛孢遗传转化及突变体筛选. 菌物学报, 40(9): 2355-2363

Deng L, Feng DD, Wang ZP, Pan H, Zhong CH, Li L, 2021. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pestalotiopsis microspora* and screening of the mutants. Mycosystema, 40(9): 2355-2363

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Pestalotiopsis microspora* and screening of the mutants

DENG Lei FENG Dan-Dan WANG Zu-Peng PAN Hui ZHONG Cai-Hong[✉] LI Li[✉]

CAS Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, CAS Engineering Laboratory for Kiwifruit Industrial Technology, CAS Innovation Academy for Seed Design, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430074, China

Abstract: The study of *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 mediated transformation of

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFD1000200), 国家自然科学基金 (31701974, 31901980); 武汉市科技局前资助科技计划 (2018020401011307)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFD1000200), the National Natural Science Foundation of China (31701974, 31901980), and Science and Technology Program Funded by Wuhan Science and Technology Bureau (2018020401011307).

✉ Corresponding authors. E-mail: lili@wbpcas.cn, zhongch@wbpcas.cn

ORCID: LI Li (0000-0002-4717-1996), ZHONG Cai-Hong (0000-0003-4982-6420), DENG Lei (0000-0001-5710-2591)

Received: 2021-03-23, accepted: 2021-04-16

Pestalotiopsis microspora KFRD-2 was carried out by using recombinant vector pCAMBgfp containing hygromycin resistance gene and GFP gene. Based on hygromycin and GFP fluorescence resistance, the transformants were screened. Through the analysis of colony morphology, mycelium growth rate, sporulation, fluorescence stability and pathogenicity verification, more than 100 positive transformants were screened out. The average transformation efficiency was up to 200 transformants per 10^6 conidia. Most transformants were no significant differences in morphological characteristics and pathogenicity as compared with the wild-type strains. Fourteen positive mutants with significant differences in mycelial morphological characteristics, sporulation or pathogenicity were obtained, which could be used to explore the virulence genes and the pathogenic mechanism of *P. microspora*.

Key words: green fluorescent protein (GFP), transformant, transformation efficiency, pathogenicity

小孢拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis microspora* 系拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 真菌, 是润楠、闽楠、石楠和油棕叶斑病、澳洲坚果和岗梅叶枯病、油茶叶枯病、美国红枫褐斑病、山核桃黑斑病的致病菌, 造成较大的经济损失 (陈全助等 2018; Han *et al.* 2019)。目前, 国内外对小孢拟盘多毛孢菌的研究主要集中在病原菌的分离鉴定及防治上, 但对该菌侵染定殖植物宿主的分子致病机理, 尤其是关键致病基因的功能知之甚少。因此, 鉴于该病原菌对不同植株的严重危害, 有必要尽快开展小孢拟盘多毛孢菌-植物互作系统相关研究。

研究病原菌在寄主内的侵染与定殖机理常采用稳定性强、观测方便的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记病原菌来实现 (Valdivia *et al.* 1996; 邹晓威等 2018; 任艺华等 2020)。根癌农杆菌介导的遗传转化方法 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 转化效率高, 近年来已成功应用于 60 多种丝状真菌的遗传转化中 (Marcel *et al.* 1998; 李俊香和古勤生 2020)。综合两者的技术优点, 农杆菌介导的 GFP 转化技术越来越多地应用于病原真菌与植物宿主的互作机制研究中, 如芒果、茶

树炭疽病 (毕方铨等 2014; 李志伟等 2020)、甘蔗梢腐病 (郭强等 2016)、枣黑斑病及缩果病 (王廷松等 2018; 田红雨等 2020)、荸荠秆枯病 (黄伟华等 2020) 等。

在前期研究中, 笔者从猕猴桃软腐病果实中分离了一株小孢拟盘多毛孢菌 KFRD-2 菌株, 通过形态学分析、ITS 及 BT 序列分析及致病力验证, 首次被确定为猕猴桃软腐病的致病菌 (Li *et al.* 2016), 其致病性和培养特征稳定, 适合作为 ATMT 方法的受体材料。本研究利用含 *gfp* 和潮霉素 B 抗性基因 (*hph*) 的双元表达载体 pCAMBgfp, 对 KFRD-2 菌株进行农杆菌介导的遗传转化, 筛选获得携带 GFP 标记的稳定转化子, 后期可用于开展侵染规律分析和防治方法开发等研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株及质粒: 小孢拟盘多毛孢菌 *Pestalotiopsis microspora* KFRD-2 菌株为本实验室从猕猴桃软腐病果实上采样分离、鉴定所得。含有双元质粒 pCAMBgfp 的农杆菌 EHA105 菌株由广东省农业科学院果树研究所毕方铨研究员惠赠, 构建方法: 将 *gfp*、*hph* 片段与经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切的 pCAMBIA1300

载体连接, 随后转入农杆菌 EHA105 中 (毕方铖等 2014)。

1.1.2 培养基: PDA (potato dextrose agar medium) 培养基: 马铃薯粉 5g/L, 葡萄糖 20g/L, 琼脂 15g/L, 121℃, 1×10⁵Pa 条件下灭菌 20min。LB 培养基: 胰蛋白胨 10g/L, 酵母提取物 5g/L, NaCl 10g/L。IM 培养基: 甘油 5g, NaCl 0.15g, MES·2H₂O 8.54g, KH₂PO₄ 1.45g, K₂HPO₄ 2.05g, CaCl₂ 0.051g, (NH₄)₂SO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, FeSO₄·7H₂O 0.0025g, 乙酰丁香酮(AS)200μmol/L (灭菌后加入), Glucose 1.0g (灭菌后加入), 121℃, 1×10⁵Pa 条件下灭菌 20min。Co-IM 培养基: 其他成分与 IM 培养基相同, 葡萄糖含量减半, 加入 15g/L 琼脂。筛选培养基: PDA 培养基中加入 120μg/mL 潮霉素 B (HmB) 和 200μmol/L 头孢霉素。

1.2 方法

1.2.1 农杆菌菌液的制备: 28℃条件下, 将含有质粒 pCAMBgfp 的农杆菌 EHA105 在 LB 平板上划线培养 48h; 随后, 挑取单菌落置于 LB 液体培养基中, 200r/min 振荡培养 48h。其中, LB 平板及液体培养基中均需添加 50μg/mL Kan 和 25μg/mL Rif。随后, 取上述培养液, 室温条件下 5 000×g 离心 5min, 用 IM 培养基将沉淀重悬至 OD₆₀₀=0.2。最后, 28℃、200r/min 培养 6–8h, 备用。

1.2.2 孢子的制备: 在已产孢的 KFRD-2 菌株 PDA 平板中加入无菌水, 用无菌涂布棒轻刮平板, 然后用两层无菌纱布过滤收集孢子, IM 液体培养基重悬孢子, 得到浓度为 1×10⁶ 个/mL 的孢子悬液。

1.2.3 农杆菌和孢子液的共转化: 将上述农杆菌菌液与孢子液各 1mL 混合均匀, 取 100μL 混合液涂布于铺有无菌玻璃纸的 Co-IM+200μmol/L 乙酰丁香酮平板上, 25℃避光共培养 48h。然后, 将玻璃纸转移至筛选培养基 (含 120μg/mL HmB 和 200μmol/L 头孢霉

素) 上, 25℃培养至出现菌落。挑取单菌落于筛选培养基 (含有 120μg/mL HmB) 上 25℃继续培养, 仍可生长的菌落为候选转化子。

1.2.4 转化子 PCR 检测: 取转化子菌块接种于铺有无菌玻璃纸的 PDA 平板上, 25℃条件下培养 6d, 收集菌丝, 提取 DNA。用于扩增潮霉素 B 抗性基因的引物序列为: HYG-F/HYG-R: 5'-AAGTTCGACAGCGTCTCCGAC-3'/5'-TCTACACAGCCATCGGTCCAG-3'。PCR 扩增体系如下: 模板 1μL, 10μmol/L 正反向引物各 0.5μL, 2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 12.5μL, ddH₂O 补至 25μL。反应条件为: 95℃ 3min; 95℃ 15s; 60℃ 15s; 72℃ 1min, 35 个循环; 72℃ 10min。PCR 产物经过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 运用 Tanon 1600 全自动数码凝胶成像分析系统 (上海天能公司, 中国) 分析结果。

1.2.5 转化子表型分析: (1) 转化子的遗传稳定性分析: 将再生的转化子接种在含 120μg/mL 潮霉素 B 的 PDA 平板上, 25℃培养 4d, 传代培养 3 次。然后, 挑取菌落边缘菌丝接种于普通 PDA 平板上传代培养 5 次。最后, 取菌落边缘菌丝再次接种至含 120μg/mL 潮霉素 B 的 PDA 平板上, 25℃培养。以野生型 KFRD-2 菌株作为对照, 若转化子正常生长则说明其具有遗传稳定性 (闫思远等 2020)。

(2) 转化子的菌落形态特征分析及生长速度测定: 取直径为 0.8cm 的菌饼接种于 PDA 平板中心, 25℃培养 5d 后采用十字交叉法测量直径。转化子生长速度=(菌落直径-0.8cm)/(2×培养时间)。以野生型 KFRD-2 菌株作为对照, 重复 3 次。

(3) 转化子的产孢情况: 取直径为 0.8cm 的菌饼接种于 PDA 培养基中心位置, 菌饼正面朝下, 25℃培养 20d 后, 在已产孢的转化子 PDA 平板中加入无菌水, 用无菌涂布棒轻刮平板, 然后用两层无菌纱布过滤收集孢子,

5 000×g 离心 5min, 弃上清, 用 1mL 无菌水悬浮孢子液, 以野生型 KFRD-2 菌株作为对照, 重复 3 次。

1.2.6 转化子的荧光检测: 随机挑取转化子的菌丝和孢子制片, 置于 Leica DFC550 荧光显微镜 (徕卡微系统股份公司, 德国) 20×下观察, 有 GFP 荧光的菌落即为阳性转化子。

1.2.7 转化子的致病性验证: 野生型 KFRD-2 菌株已被证实会导致猕猴桃果实软腐 (Li *et al.* 2016), 因此以 ‘东红’ 品种的猕猴桃果实为材料, 75%酒精消毒 30s, 无菌水冲洗 3 遍后备用。用 1mL 注射器针头在果实表面刺 8 个小孔, 运用两种方式进行接种, 每个转化子每种方法设置 3 个重复: (1) 取直径为 0.8cm 的菌饼, 将菌饼接种到果实上, 使菌丝体与果实表面直接接触; (2) 准备浓度为 10^6 个/mL 的孢子液, 吸取 10μL, 接种于针刺的猕猴桃果实上。接种后, 将猕猴桃果实置于保湿盒中 25℃培养, 6d 后测定病斑直径。以野生型 KFRD-2 菌株作为对照。

2 结果与分析

2.1 潮霉素筛选浓度的确定

为确定 KFRD-2 野生型菌株的潮霉素筛选浓度, 取菌块接种至含不同潮霉素浓度的

PDA 平板中央, 25℃培养 4d 后观察菌落生长情况: 发现在不含潮霉素的 PDA 平板上, 菌株正常生长; 在含 20–80μg/mL 潮霉素的 PDA 平板上, 菌株生长受到不同程度的抑制; 在含 100μg/mL 潮霉素的 PDA 平板上, 菌株基本停止生长, 因此潮霉素对 KFRD-2 菌株的最低抑菌浓度为 100μg/mL (图 1)。为进一步保证筛选效率, 本研究中将 120μg/mL 设定为转化子的筛选浓度。经数次筛选, 获得了 100 余株可稳定遗传的转化子。

2.2 转化子的遗传稳定性检测

使用潮霉素特异性引物对野生型 KFRD-2 菌株和所有转化子进行 PCR 检测, 野生型 KFRD-2 菌株及阴性对照未扩增得到目的条带, 阳性质粒 pCAMBgfp 与转化子均可扩增得到 900bp 左右的目的条带 (图 2)。

2.3 转化子的表型分析

通过对 KFRD-2 野生型菌株和转化子的表型、生长速度和产孢量进行测定, 发现大部分转化子的菌落形态与野生型基本一致, 菌丝生长初期白色浓密, 后期边缘略稀疏, 且菌丝生长速度、产孢量与野生型菌株无明显差异, 如转化子 PM-13。但有 14 株转化子在菌落表型特征、菌丝平均生长速度及产孢量等方面与野生型菌株具有明显差异。如转化子

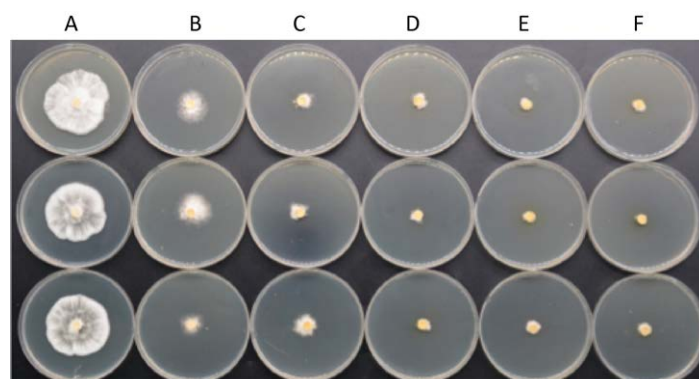


图 1 不同浓度潮霉素 B 对野生型 KFRD-2 菌株的生长抑制情况 潮霉素浓度 A–F: 0, 20, 40, 60, 80, 100μg/mL

Fig. 1 Growth inhibition of *Pestalotiopsis microspora* wild type strain KFRD-2 on PDA medium with different concentration of hygromycin B. A–F: 0, 20, 40, 60, 80, 100μg/mL.

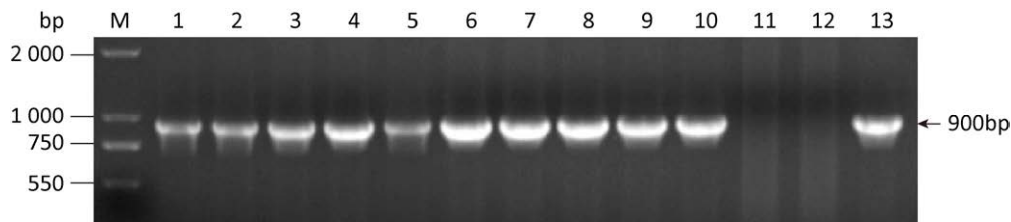


图 2 部分转化子 PCR 检测电泳图 M: DL 2000 marker; 1–10: 转化子; 11: 野生型菌株; 12: 阴性对照; 13: pCAMBgfp

Fig. 2 PCR verification for partial transformants of *Pestalotiopsis microspora*. M: DL 2000 marker; 1–10: Transformed strains; 11: Wild type strain; 12: Negative control; 13: pCAMBgfp.

PM-1 菌丝更浓密，但不产孢；转化子 PM-2 菌丝灰褐色，产孢量显著增加（表 1，图 3）。菌丝及分生孢子结构与野生型一致，在激发光下均会产生绿色 GFP 荧光，说明外源 *gfp* 基因已在转化子中正常表达且能稳定遗传（图 4）。

2.4 荧光显微检测

除不产孢的 PM-1 菌株外，其他转化子

表 1 转化子的菌丝平均生长速度及产孢量

Table 1 The mycelium growth rate and sporulation of *Pestalotiopsis microspora* transformants

菌株	生长速度	产孢量	菌株	生长速度	产孢量
Strain	Mycelium growth rate (mm/d)	Sporulation (×10 ⁵ /mL)	Strain	Mycelium growth rate (mm/d)	Sporulation (×10 ⁵ /mL)
KFRD-2	5.182	8.75	PM-13	5.153	8.69
PM-2	6.221	461.25	PM-24	4.777	35.00
PM-10	4.406	122.50	PM-9	4.792	30.25
X6	5.389	52.00	PM-20	5.050	28.75
PM-12	6.197	44.25	PM-11	5.471	25.75
PM-7	4.989	43.75	X2	4.855	19.25
PM-16	5.402	40.75	PM-18	6.261	5.50
PM-12-2	5.049	40.00	PM-1	5.992	0

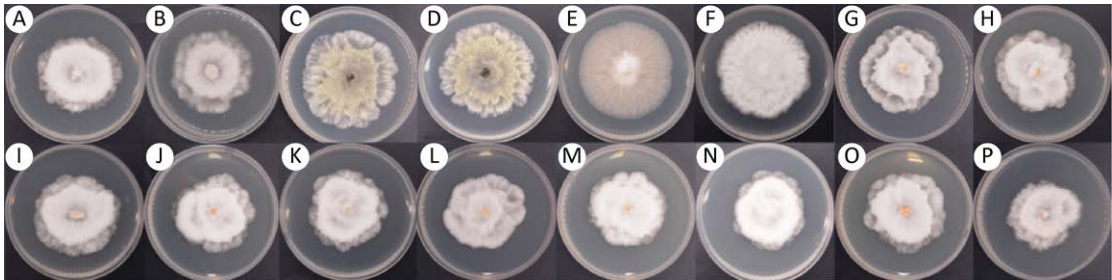


图 3 转化子在 PDA 平板上的菌落形态 A: KFRD-2; B: PM-13; C: PM-2; D: PM-12; E: PMb-18; F: PM-1; G: PM-11; H: PM-16; I: X6; J: PM-20; K: PM-12-2; L: X2; M: PM-9; N: PM-24; O: PM-7; P: PM-10

Fig. 3 The cultural characteristics of *Pestalotiopsis microspora* transformants on PDA medium. A: KFRD-2; B: PM-13; C: PM-2; D: PM-12; E: PMb-18; F: PM-1; G: PM-11; H: PM-16; I: X6; J: PM-20; K: PM-12-2; L: X2; M: PM-9; N: PM-24; O: PM-7; P: PM-10.

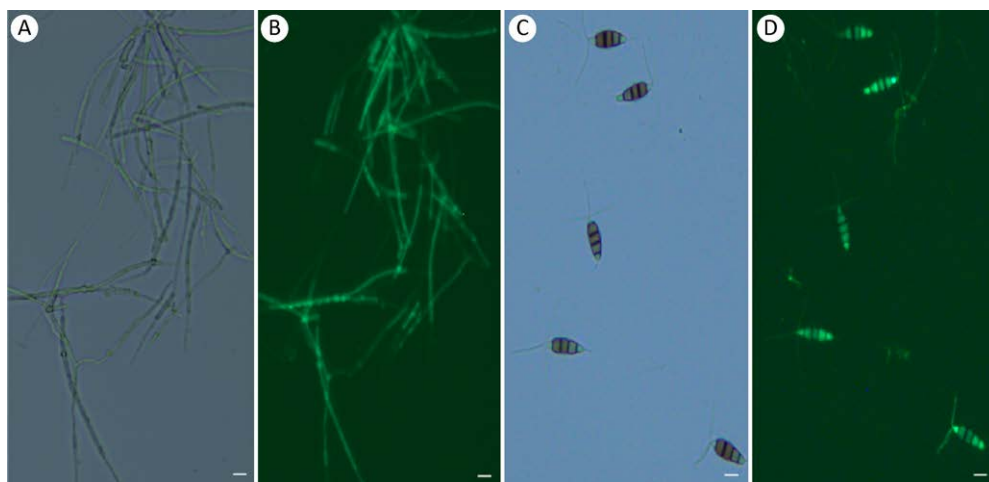


图 4 转化子的荧光显微观察 A, C: 明场下菌丝及孢子; B, D: 紫外激发光下菌丝及孢子. 标尺=5 μ m
Fig. 4 Transformants verification observed under optical microscope. A, C: Mycelium and spore under bright field; B, D: Mycelium and spore under green fluorescence. Bars=5 μ m.

2.5 致病力验证

选择野生型菌株、17 株菌丝生长速度、产孢量与野生型菌株一致的菌株, 12 株菌丝生长速度、产孢量与野生型菌株存在明显差异的菌株, 运用菌块或孢子液接种猕猴桃。结果可见, 转化子和野生型菌株均有明显的感病症状; 30%转化子与野生型菌株的致病

力基本一致, 但 30%转化子(如 PM-1)存在致病力减弱, 40%转化子(如 PM-2)存在致病力增强现象(图 5)。转化子的菌丝生长速度、产孢能力改变与致病力变化之间存在一定相关性, 后期可针对致病力改变的转化子的 *gfp* 基因插入位点进行深入分析, 确定关键致病基因, 进一步阐明病原菌的致病机理。



图 5 转化子菌块对猕猴桃果实的致病性检测 A: KFRD-2; B: PM-13; C: PM-1; D: PM-2; E: PM-11; F: PM-16; G: X6; H: X2; I: PM-9; J: PM-7

Fig. 5 The pathogenicity of *Pestalotiopsis microspora* transformants to kiwifruit (agar block). A: KFRD-2; B: PM-13; C: PM-1; D: PM-2; E: PM-11; F: PM-16; G: X6; H: X2; I: PM-9; J: PM-7.

3 讨论

ATMT 方法具有受体材料范围广、转化效率高、重复性好、易获得稳定遗传的转化子且单拷贝插入突变体多等优点,近年来得到了广泛应用 (Michielse *et al.* 2005)。李俊香和古勤生 (2020) 认为 ATMT 方法应用中 T-DNA 通常为单拷贝且随机插入基因组中,在不同的位点插入可能会导致转化子的菌落形态、生长速度或致病力出现明显差异。丁婷等 (2017) 也认为外源基因转入会增强转化子的代谢负荷,导致转化子的生长特性改变。近几年,上述观点在很多植物致病或内生真菌 ATMT 的转化子构建中得到了验证。贺春萍等 (2007) 构建了含 6 855 个转化子的稻瘟病菌突变体库,发现其中 23 株突变体完全丧失致病能力。徐后娟等 (2009) 在链格孢突变体库中筛选得到弱毒菌株。徐荣旗等 (2010) 通过构建大丽轮枝菌的突变转化子库,从 2 628 个转化子中筛选得到一系列表型、致病力改变的突变子及果胶酶、蛋白酶、淀粉酶分泌缺失的突变体。冯娟等 (2010) 筛选获得多株生长速度、产孢能力及致病力减弱的灰葡萄孢 T-DNA 插入突变体。毕方铖等 (2014) 在构建 GFP 荧光的芒果胶孢炭疽病菌时,得到 11 株致病力减弱或缺失的转化子,另 2 株致病力增强。纪策等 (2018) 发现 200 株疣孢霉 T-DNA-转化子中 65 株的生长速度、菌落形态及产孢量具有明显变化。孙华等 (2019) 认为 T-DNA 的插入会造成拟轮枝镰刀孢荧光转化子的产孢量改变。黄伟华等 (2020) 对荸荠秆枯病菌进行转化后,筛选得到了表型和致病性缺陷突变体, T-DNA 单拷贝插入率达 77.8%。

拟盘多毛孢菌的 ATMT 研究相对较少,张林平等 (2012) 以及张林平和叶建仁 (2014) 构建了根癌农杆菌介导的异角状拟盘多毛孢

菌 *P. heterocornis* 转化系统,并从转化子库中筛选出 15 株菌落形态、菌落生长速度、产孢量及致病性变化明显的遗传稳定转化子。本研究首次通过农杆菌介导的转化法,利用含有 *hph* 和 *gfp* 基因的表达载体 pCAMBgfp 转化小孢拟盘多毛孢菌 KFRD-2 菌株的孢子,共获得了 100 多株具有绿色荧光且菌落形态、致病力与野生型菌株无明显差异的稳定遗传转化子,为阐明小孢拟盘多毛孢菌在宿主植物中的侵染研究奠定了基础。同时,也首次获得了 14 株生长速度、产孢量及致病力存在明显差异的突变体。目前,我们正利用 GFP 标记菌株进行小孢拟盘多毛孢菌对猕猴桃植株的侵染规律研究;此外,利用 Tail-PCR 确定表型或致病力存在差异的转化菌株的 T-DNA 插入位点,并对相应基因展开功能验证,确定关键致病基因,进一步深入分析小孢拟盘多毛孢菌-宿主植物的分子作用机理。

[REFERENCES]

- Bi FC, Dai HF, Meng XC, 2014. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of mango *Colletotrichum gloeosporioides* and screening of the mutants defective in pathogenicity. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 34(8): 47-51 (in Chinese)
- Chen QZ, Jin YJ, Guo MM, Song Z, Feng LZ, Ding Y, Chen JS, 2018. Pathogen identification of *Phoebe bournei* leaf spot and determination of its biological characteristics. Acta Phytopathologica Sinica, 48(3): 313-323 (in Chinese)
- Ding T, Gu SY, Su B, Wang Q, Chen XJ, 2017. GFP-tagging and colonization observation of the endophytic fungus DZJ07 from *Eucommia ulmoides*. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 32(6): 126-133 (in Chinese)
- Feng J, Zhu TH, Cui ZF, Wang K, 2010. Construction of T-DNA insertion mutant of *Botrytis cinerea* via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation

- and sequence analysis of insertion site. *Acta Microbiologica Sinica*, 50(2): 169-173 (in Chinese)
- Guo Q, Wang X, Xu SQ, Wang JH, Cui YP, Zhang MQ, 2016. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of sugarcane pokkah boeng pathogen YN41. *Genomics and Applied Biology*, 35(5): 1189-1194 (in Chinese)
- Han S, Wang YL, Wang M, Li SJ, Ruan RY, Qiao TM, Zhu TH, 2019. First report of *Pestalotiopsis microspora* causing leaf blight disease of *Machilus nanmu* in China. *Plant Disease*, 11: 2963
- He CP, Lin CH, Liao QH, Li R, Zheng FC, 2007. Construction of a T-DNA insertion mutant library of *Magnaporthe grisea* and identification of pathogenicity-related mutants. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 28(1): 80-84 (in Chinese)
- Huang WH, Wu BQ, Yan MX, 2020. Development of *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Cylindrosporium eleocharidis* and analysis of T-DNA insertional mutants. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 33(8): 1696-1702 (in Chinese)
- Ji C, Liu Y, Li D, Sossah FL, Yang Y, Li Y, 2018. Generation of *Agrobacterium*-mediated transformation system and construction of T-DNA insertional mutant library for *Hypomyces perniciosus*. *Mycosystema*, 37(8): 1027-1034 (in Chinese)
- Li JX, Gu QS, 2020. The research progresss of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformant in fungus. *Jiangsu Agricultural Science*, 48(3): 43-49 (in Chinese)
- Li L, Pan H, Chen MY, Zhong CH, 2016. First report of *Pestalotiopsis microspora* causing postharvest rot of kiwifruit in Hubei Province, China. *Plant Disease*, 10: 2161
- Li ZW, Tan YM, Ren XY, Liu YX, Huang YH, Liu ZY, 2020. Study on green fluorescent protein gene makers and infection of pathogens of tea anthracnose. *Genomics and Applied Biology*, 39(8): 3510-3518 (in Chinese)
- Marcel JAG, Paul B, Paul JJH, Alice GMB, 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 16: 839-842
- Michielse CB, Hooykaas PJJ, van den Hondel CA, Ram AFJ, 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*, 48(1): 1-17
- Ren YH, Niu CK, Han LX, Zhang R, Sun GY, 2020. Construction of *Alternaria alternata* GFP-tagged strains based on PEG-mediated protoplast transformation and its infection characters to apple floral tissues. *Mycosystema*, 39(12): 2277-2284 (in Chinese)
- Sun H, Ma HX, Ding MJ, Li P, Shi J, Liu SS, 2019. Construction and evaluation of ATMT mutant library of *Fusarium verticillioides*. *Scientia Agricultura Sinica*, 52(8): 1380-1388 (in Chinese)
- Tian HY, Shi XM, Zhang M, Wang YC, Zhang SW, Ran LX, 2020. Infection of four GFP-labelled *Alternaria* species in *Ziziphus jujuba*. *Non-wood Forest Research*, 38(2): 84-92 (in Chinese)
- Valdivia RH, Hromockyj AE, Monack D, Ramakrishnan L, Falkow S, 1996. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene*, 173(1): 47-52
- Wang TS, Wang PC, Guo JL, Wang L, 2018. Construction of a GFP-labeled strain of black spot pathogen of jujube, *Zizyphus jujuba*. *Journal of Tarim University*, 30(6): 7-11 (in Chinese)
- Xu HJ, Xu RY, Li DC, 2009. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Alternaria alternata* and identification of hypovirulent mutant. *Genomics and Applied Biology*, 28(6): 1056-1062 (in Chinese)
- Xu RQ, Wang JN, Chen JY, Dai XF, 2010. Analysis of T-DNA insertional flanking sequence and mutant phenotypic characteristics in *Verticillium dahliae*. *Scientia Agricultural Sinica*, 43(3): 489-496 (in Chinese)
- Yan SY, Du J, Yang FL, Ren MM, Li JH, Gu PW, 2020. Establishment of genetic transformation system of *Lycium barbarum* endophytic fungus *Fusarium*

- nematophilum* NQ8G II 4 using PEG-mediated method and transformants evaluation. *Acta Horticulturae Sinica*, 47(12): 2385-2396 (in Chinese)
- Zhang LP, Ye JR, 2014. Biological characterization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformant in *Pestalotiopsis heterocornis*. *China Forestry Science and Technology*, 28(6): 15-18 (in Chinese)
- Zhang LP, Ye JR, Li YY, Huang L, Xu JT, Zhang Y, 2012. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system for *Pestalotiopsis heterocornis*. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)*, 36(1): 28-32 (in Chinese)
- Zou XW, Xia L, Wang N, Jiang ZY, Li L, Zheng Y, 2018. Application of green fluorescent protein (eGFP)-tagged strains of *Sporisorium reilianum*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 48(4): 567-571 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 毕方铎, 戴宏芬, 孟祥春, 2014. 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. *热带农业科学*, 34(8): 47-51
- 陈全助, 金亚杰, 郭朦朦, 宋漳, 冯丽贞, 丁奕, 陈金顺, 2018. 闽楠叶斑病病原鉴定及其生物学特性测定. *植物病理学报*, 48(3): 313-323
- 丁婷, 顾双月, 苏博, 王其, 陈小洁, 2017. 杜仲内生真菌 DZJ07 的 GFP 标记及在小麦植株中的定殖. *华北农学报*, 32(6): 126-133
- 冯娟, 朱廷恒, 崔指峰, 汪琨, 2010. 农杆菌介导的灰葡萄孢 T-DNA 插入突变体库构建及插入位点分析. *微生物学报*, 50(2): 169-173
- 郭强, 王鑫, 徐世强, 王继华, 崔一平, 张木清, 2016. 农杆菌介导甘蔗梢腐病病原菌 YN41 的遗传转化. *基因组学与应用生物学*, 35(5): 1189-1194
- 贺春萍, 林春花, 廖奇亨, 李锐, 郑服丛, 2007. 稻瘟病菌 T-DNA 插入突变体库构建及致病相关突变体筛选. *热带作物学报*, 28(1): 80-84
- 黄伟华, 吴碧球, 颜梅新, 2020. 根癌农杆菌介导荸荠秆枯病菌转化体系构建及突变体筛选. *西南农业学报*, 33(8): 1696-1702
- 纪策, 刘源, 李丹, Sossah Frederick Leo, 杨阳, 李玉, 2018. 有害疣孢霉 *Hypomyces perniciosus* 遗传转化体系的建立及其突变体库的构建. *菌物学报*, 37(8): 1027-1034
- 李俊香, 古勤生, 2020. 根癌农杆菌介导的真菌遗传转化研究进展. *江苏农业科学*, 48(3): 43-49
- 李志伟, 谭玉梅, 任锡毅, 刘永翔, 黄永会, 刘作易, 2020. 茶树炭疽病原菌的绿色荧光蛋白基因标记及其侵染研究. *基因组学与应用生物学*, 39(8): 3510-3518
- 任艺华, 牛长凯, 韩立新, 张荣, 孙广宇, 2020. PEG 介导原生质体转化构建链格孢荧光菌株及其侵染苹果花器特征. *菌物学报*, 39(1): 1-8
- 孙华, 马红霞, 丁梦军, 李坡, 石洁, 刘树森, 2019. 拟轮枝镰孢 ATMT 突变体库的构建与分析. *中国农业科学*, 52(8): 1380-1388
- 田红雨, 史晓梦, 张敏, 王亚聪, 张书蔚, 冉隆贤, 2020. GFP 标记的 4 种链格孢菌对枣树的侵染研究. *经济林研究*, 38(2): 84-92
- 王廷松, 王鹏程, 郭俊玲, 王兰, 2018. 枣黑斑病菌绿色荧光蛋白标记菌株的构建. *塔里木大学学报*, 30(6): 7-11
- 徐后娟, 徐荣燕, 李多川, 2009. 链格孢农杆菌介导转化体系的构建及弱毒突变株验证. *基因组学与应用生物学*, 28(6): 1056-1062
- 徐荣旗, 汪佳妮, 陈捷胤, 戴小枫, 2010. 棉花黄萎病 T-DNA 插入突变体表型特征和侧翼序列分析. *中国农业科学*, 43(3): 489-496
- 闫思远, 杜鹃, 杨富龙, 任苗苗, 李嘉泓, 顾沛雯, 2020. PEG 介导枸杞内生真菌 NQ8 II 4 遗传转化及转化子评价. *园艺学报*, 47(12): 2385-2396
- 张林平, 叶建仁, 2014. 农杆菌介导的异角状拟盘多毛孢菌 T-DNA 转化子生物学特性分析. *林业科技开发*, 28(6): 15-18
- 张林平, 叶建仁, 李月阳, 黄麟, 许剑涛, 张扬, 2012. 根癌农杆菌介导的异角状拟盘多毛孢菌转化系统研究. *南京林业大学学报 (自然科学版)*, 36(1): 28-32
- 邹晓威, 夏蕾, 王娜, 姜兆远, 李莉, 郑岩, 2018. 玉米丝黑穗病菌绿荧光蛋白标记菌株的构建与应用. *植物病理学报*, 48(4): 567-571

(本文责编: 韩丽)