

农杆菌介导的甜瓜蔓枯病菌遗传转化体系的建立

任海英¹, 方丽¹, 李岗², 茹水江¹, 王汉荣¹

1 浙江省农业科学院 植物保护与微生物研究所, 杭州 310021

2 浙江省农业科学院 农产品质量标准研究所, 杭州 310021

摘要: 甜瓜蔓枯病是当前危害瓜类的主要病害, 严重影响甜瓜的产量和品质, 但是蔓枯病菌 *Didymella bryoniae* 病原学研究还非常落后, 关于该菌功能基因的研究还未见报道。本研究以携带潮霉素 B 磷酸转移酶基因 (*hph*) 的 pBIG2RHPH2 作为转化载体, 根癌农杆菌 C58C1 作为转化介体, 转化甜瓜蔓枯病菌的强致病菌株 DB11。研究发现, 甜瓜蔓枯病菌的最优转化体系为: 甜瓜蔓枯病菌的分生孢子悬浮液浓度为 1×10^6 个孢子/mL, 农杆菌悬浮液 OD_{600} 为 0.15, 共培养时间 48 h, 诱导培养基中添加 200 $\mu\text{g/mL}$ 乙酰丁香酮, 选择培养基添加 100 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素 B、200 $\mu\text{g/mL}$ 头孢噻肟钠、200 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素和 200 $\mu\text{g/mL}$ 四环素。 1×10^5 个蔓枯病菌分生孢子可以产生 45 个左右的转化子, 随机挑取 3 个转化子进行 PCR 和 RT-PCR 检测发现, 在不含潮霉素 B 的 PDA 培养基平板上转化子连续培养 5 代后, *hph* 基因仍能稳定存在和转录, Southern blotting 检测发现, T-DNA 都是单拷贝插入 3 个转化子的染色体。本研究建立的甜瓜蔓枯病菌的转化体系将为该病菌的功能基因研究和寄主与病原菌的互作研究提供重要技术支撑。

关键词: 甜瓜蔓枯病菌, 根癌农杆菌介导的转化, T-DNA 插入突变

Transformation of *Didymella bryoniae* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

Haiying Ren¹, Li Fang¹, Gang Li², Shuijiang Ru¹, and Hanrong Wang¹

1 Institute of Plant Protection and Microbe, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

2 Institute of Quality Standards for Agricultural Products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

Abstract: Gummy stem blight, a plant disease caused by *Didymella bryoniae*, is one of the major diseases in melon. The disease can seriously reduce melon yield and quality. However, little information is available on the genetics and functional genomics of the fungal pathogen. In this study, we developed an *Agrobacterium*-mediated transformation system for *D. bryoniae* by using a universal pathogenic isolate DB11 and the *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 carrying plasmid pBIG2RHPH2 harboring the hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*). Total 45 transformants could be obtained per 1×10^5 spores when 1×10^6 spores per milliliter of *D. bryoniae* spore suspension were cocultivated with *Agrobacterium* cells at $OD_{600}=0.15$ for 48 h in the presence of induction medium (pH 5.2) containing acetosyringone at 200 $\mu\text{g/mL}$ and selection medium contained 100 $\mu\text{g/mL}$ of hygromycin B and 200 $\mu\text{g/mL}$ of cefotaxime sodium, ampicillin and tetracycline, respectively. The transformants were stable when grown on PDA medium without hygromycin B for five times and were verified by PCR amplification with the *hph* primers and by Southern blot analysis with the *hph* probe. The transformation system will be useful for further studies of functional genes in *D. bryoniae*.

Keywords: *Didymella bryoniae*, *Agrobacterium* mediated transformation, T-DNA insertional mutagenesis

Received: January 7, 2010; **Accepted:** April 9, 2010

Supported by: Doctor Startup and International Cooperation Foundation of Zhejiang Academy of Agricultural Sciences.

Corresponding author: Hanrong Wang. Tel: +86-571-86404224; Fax: +86-571-86404225; E-mail: wanghr@yaho.com.cn

浙江省农业科学院博士启动经费和国际合作项目资助。

甜瓜是我国重要的经济作物, 瓜类蔓枯病是当前瓜类生产的主要病害, 严重影响甜瓜的产量和品质, 在甜瓜的幼苗期至采收期均可发生, 侵染植株的地上各部, 生育前期易发病, 生殖生长盛期最严重^[1]。无论是在冬春日光温室, 还是早春和秋后大棚栽培均有发生, 其危害程度远高于甜瓜枯萎病和甜瓜疫病, 在生产上若不及早防治, 植株死亡率可达 30%~40%, 造成严重减产, 是一种严重的全球性真菌病害, 侵染黄瓜、西瓜、甜瓜、南瓜和西葫芦等^[2], 对寄主植物造成不同程度的损害。瓜类蔓枯病菌的有性世代是子囊菌瓜黑腐小球壳菌 *Mycosphaerella melonis* (Passerini) Chiu et Walker, 无性态 *Ascochyta cucumis* Fautr. et Roum 属半知菌瓜叶单胞菌^[3]。由于该菌孢子变异大, 学名迄今仍未统一, 有记载的有 *Didymella bryoniae*、*Ascochyta cucumis*、*A. citrullina*、*A. melonis*、*A. cucumeris*、*Phyllosticta citrullina*、*P. orbicularia*、*Sphaerella citrullina*、*S. melonis*、*Didymella melonis*、*Didymosphaeria melonis* 等^[3]。但是最近几年的文献以使用 *D. bryoniae*^[1,4-5]学名的较多。病菌以子囊壳、分生孢子器、菌丝体潜伏在病残组织上留在土壤中越冬, 翌年产生孢子进行初侵染。植物染病后释放出的分生孢子借风雨传播, 进行再侵染。7 月中旬气温 20℃~25℃, 潜育期 3~5 d, 病斑出现 4~5 d 后, 病部即产生小黑粒点。分生孢子在株间传播距离为 6~8 m^[3]。甜瓜品种间抗病性差异明显: 一般薄皮脆瓜属抗病体系, 而厚皮甜瓜较感病^[3]。蔓枯病菌病原学研究还比较落后。国内外对该病的研究主要集中在菌体培养、产孢、抗性品种筛选、防治药剂筛选以及基于分子标记的分类等^[1-8], 关于该菌的功能基因以及与寄主的互作研究未见报道。建立一种简单、快速、高效的甜瓜蔓枯病菌转化体系是研究该菌功能基因以及甜瓜-蔓枯病菌互作的必需工具。

传统的真菌遗传转化方法是采用原生质体转化, 这种方法费时费力, 效率低下。而根癌农杆菌介导的遗传转化最初主要在植物上使用, 例如水稻^[9]、大豆^[10]、高粱^[11]等都成功得到农杆菌的转化株系, 后来这种方法在真菌上进行尝试, 效果也比较好^[12-13],

一般 10⁶ 个孢子能产生 300~500 个转化子^[14], 10⁵ 个孢子能产生 53 个转化子^[15]、10⁴ 个孢子能产生 156 个转化子^[16]。产生的转化子在没有选择压力的情况下连续培养 5 代, 89%~98% 转化子有丝分裂稳定^[15,17-18]。T-DNA 单拷贝插入的几率比较高, 而且 T-DNA 插入位置的旁侧序列很容易通过 TAIL-PCR 扩增得到^[14,19-20], 农杆菌转化产生的真菌转化子很容易发生表型以及致病性的突变, 而且表型与 T-DNA 共分离的几率比较高, 这为研究真菌的功能基因提供了可能, 农杆菌介导的植物病原真菌的转化方法现在成为植物病理学研究的重要技术手段。

甜瓜蔓枯病菌遗传转化体系的建立是在分子水平上研究病原菌致病机制的前提, 同时有效地转化系统可以用来导入有益的外源基因, 获得带有目的性状的工程菌, 而后者可能直接用于生产实践, 为病害防治提供一种新的办法。但是, 遗传转化的效率极大地影响着真菌功能基因组学研究的开展和深入。本研究以一种农杆菌 C58C1 及携带潮霉素抗性的质粒 pBIG2RHPH2 为介导, 以强致病力菌株 *D. bryoniae* DB11 为出发菌株, 产生甜瓜蔓枯病菌的 T-DNA 插入转化子, 旨在建立一种简单、快速、高效的甜瓜蔓枯病菌的转化体系, 为甜瓜蔓枯病菌功能基因组的研究打下良好的基础。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

甜瓜蔓枯病菌 *D. bryoniae* DB11, 浙江省农业科学院经济作物病害研究室保存。

根癌农杆菌 *A. tumefaciens* 菌株 C58C1::pBIG2RHPH2 由日本京都府立大学 Kubo 教授惠赠, 在 YEB 培养基 (含 25 μg/mL 新霉素) 上生长 48 h 备用。

1.2 培养基

YEB 培养基: 牛肉浸膏 5 g/L, 酵母膏 1 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 蔗糖 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 4 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.4, 121℃ 灭菌 15 min 备用。

马铃薯葡萄糖培养基 (PDA): 去皮马铃薯 200 g, 加 1 L 水煮沸 20 min, 过滤, 弃薯块取滤液,

加入葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 定容至 1 L, 121℃ 灭菌 15 min 备用。

MM 培养基: 葡萄糖 5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mg/L, CaCl_2 10 mg/L, KCl 0.15 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, NH_4Cl 1 g/L, NaH_2PO_4 1 g/L, K_2HPO_4 3 g/L。

IM 培养基: 10 mL MM, 50% 甘油 0.1 mL, 1 mol/L 脂肪酸甲酯磺酸盐 (MES) (not pH'd) 0.4 mL, 筛选浓度的乙酰丁香酮, 20% 葡萄糖 0.1 mL。

1.3 甜瓜蔓枯病菌分生孢子悬浮液的制备

甜瓜蔓枯病菌分生孢子的产生根据本实验室以前发表的方法^[21]。使用 0.01% 的吐温收集 5~7 个真菌平板的分生孢子。灭菌的 miracloth 过滤真菌孢子至 50 mL 的离心管内。5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。10 mL 灭菌的 ddH₂O 重新悬浮孢子, 然后 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 1 mL ddH₂O 悬浮分生孢子, 血细胞计数器观察孢子浓度。用 ddH₂O 调整孢子浓度至 1×10^6 个孢子/mL。

1.4 抗生素对供试蔓枯病菌和农杆菌的影响测定

1.4.1 平板法测定不同浓度潮霉素 B 对甜瓜蔓枯病菌孢子萌发和菌丝生长的抑制

配制含潮霉素 B 浓度梯度 (0、25、50、100、150、200 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 PDA 培养基平板, 将上述 1.3 中制备的孢子悬浮液稀释 1 000 倍, 取 10 μL 蔓枯病菌孢子悬浮液的稀释液均匀涂布平板, 每培养皿平均 50 个分生孢子, 28℃ 培养 4 d 观察菌落生长情况。打孔器取同等菌龄和直径的菌碟放置到平板中心, 28℃ 培养 7 d 观察菌落生长情况。每个处理重复 3 次。

1.4.2 头孢噻肟钠、氨苄青霉素和四环素在 IM 培养基上对农杆菌生长的抑制

配制含 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素+200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻肟钠+200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素的共培养培养基 (IM) 平板, 取 10 μL C58C1::pBIG2RHPH2 菌液均匀涂布到固体平板上, 待培养基吸收菌液后, 28℃ 倒置培养 4 d 观察菌落生长情况, 没有任何抗生素的共培养培养基 (IM+AS+琼脂 15 g/L) 的平板培养农杆菌作对照。每个处理重复 3 次。

1.5 转化与筛选

1.5.1 转化用农杆菌菌液的准备

A. tumefaciens 菌株 C58C1::pBIG2RHPH2 和 C58C1 在 YEB 培养基平板 (含 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 新霉素或者 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 新霉素) 上涂布活化, 30℃ 过夜培养, 挑取单克隆接种于 10 mL MM 液体培养基 (含 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 新霉素或者 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 新霉素), 28℃、200 r/min 培养 1~2 d, 得到培养液, 然后用 IM 液体培养基 (添加设计浓度的 AS, 见表 1) 稀释 10 倍, 200 r/min 培养 4~6 h, 测定 OD_{600} , 并调整 OD_{600} 至设计浓度 (表 1)。

表 1 不同条件下甜瓜蔓枯病菌的转化效率

Table 1 Ratio of transformant of *D. bryoniae* conidia in the different conditions

OD_{600} of <i>Agrobacterium</i>	Co-culture time (h)	AS concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Transformant number	Significant difference*	
0.12	24	100	0	e	
		200	6	e	
		300	9	cd	
	48	100	100	5	e
			200	9	cd
		300	15	bc	
			100	4	e
		36	200	5	e
			300	10	c
	100		8	d	
	24	200	12	c	
			300	10	c
100		15	bc		
		0.15	48	200	45
300		50		a	
100		18		b	
36	200	50	a		
		300	52	a	
	100	3	e		
		24	200	4	e
	300	5		e	
	100	8	d		
0.18			48	200	10
300		13		b	
100		3		e	
36		200	9	cd	
			300	10	c

*: different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

1.5.2 共培养和筛选

上述1.3中制备好的6管孢子悬浮液(100 μL /管), 其中5管加入100 μL C58C1::pBIG2RHPH2菌液, 第6管加入100 μL C58C1菌液。先在共培养培养基(IM+AS+琼脂 15 g/L)上平铺硝酸纤维素滤膜(孔径0.45 μm 、直径45 mm)(Whatman, Hillsboro, OR公司产品), 将6个离心管内的混合液分别均匀涂布于滤膜上, 封口膜封好, 22 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 培养至设计时间(表1), 滤膜含菌面朝上转移至MM培养基(含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素+200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻肟钠+200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素+琼脂 15 g/L)平板上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养2 d, 挑取单个转化子接种到新的PDA平板(含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素B)上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养4 d, 接着紫外灯照射7 d(12 h黑暗+12 h紫外照射)直至分生孢子产生, 新生的分生孢子用无菌水悬浮后, 涂布接种到PDA平板(含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素B)上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h, 挑取萌发的单孢子菌落接种到PDA平板(含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素)上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养7 d, 保存菌种, 备用。

1.5.3 影响农杆菌转化效果的因素

分别进行农杆菌浓度 OD_{600} (0.12、0.15、0.18)、共培养的筛选时间(24 h、48 h、36 h)、AS浓度(100、200、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)不同组合方式下对农杆菌转化效果的影响试验, 统计每100 μL 甜瓜蔓枯病菌分生孢子悬浮液转化产生的转化子数目。每处理重复6次, 取平均值。采用SAS(9.1)的Duncan法三因素完全随机实验进行多重比较, $P<0.05$ 水平上分析各处理间转化效率的显著性差异。

1.6 转化子的筛选鉴定

为测定 hph 基因在转化子基因组中的遗传稳定性, 随机选取3个蔓枯病菌转化子接种到不含潮霉素B的PDA培养基上连续培养5代, 然后接种于PDA液体培养基(含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素B)中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养4 d, 备用。

分别提取甜瓜蔓枯病菌基因组DNA和RNA, 制备cDNA, 以DNA或者cDNA为模板, 引物Up primer: 5'-GCATGAAAAAGCCTGAACTCACCGC-3', Down primer: 5'-CGCTATTTCTTTGCCCTCGGACGAG-3', 进行 hph 基因的PCR和RT-PCR扩增, 检测 hph 的整合和转录。PCR程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$

60 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 30个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

将转基因株系的基因组DNA进行EcoRI单酶切后, 进行琼脂糖电泳分析。以地高辛探针标记和检测试剂盒(Roche公司产品)标记 hph 的PCR产物为探针, Southern blotting检测T-DNA的插入拷贝数。

2 结果与分析

2.1 抗生素对供试蔓枯病菌和农杆菌的影响测定

2.1.1 平板法测定不同潮霉素B浓度对甜瓜蔓枯病菌分生孢子萌发和菌丝生长的影响

0~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素B对甜瓜蔓枯病菌的分生孢子萌发基本没有抑制作用, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素B对孢子的萌发抑制作用较强, 但是少数孢子仍能萌发, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素B条件下分生孢子完全不能萌发(图1A)。与分生孢子相比, 菌丝对潮霉素B更加敏感, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素B强烈抑制菌丝的生长。所以本转化实验就选择100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素B筛选阳性转化子(图1B)。

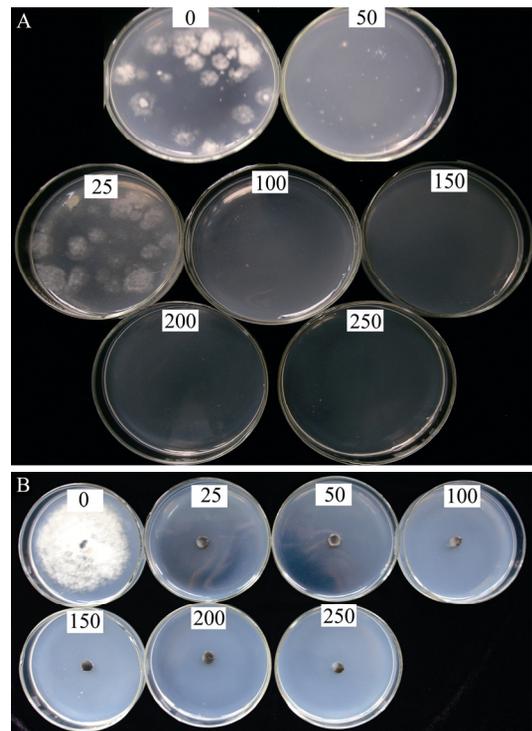


图1 甜瓜蔓枯病菌在含有不同浓度潮霉素B的PDA平板上的分生孢子萌发(A)和菌丝生长(B)情况

Fig. 1 Conidia germination (A) and hyphae growth (B) of *Didymella bryoniae* on PDA media with different concentrations of hygromycin B (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.1.2 头孢噻肟钠、氨苄青霉素和四环素在共培养培养基上对农杆菌的抑制作用

C58C1::pBIG2RHPH2 在不含任何抗生素以及含 200 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素+200 $\mu\text{g/mL}$ 头孢噻肟钠+200 $\mu\text{g/mL}$ 四环素的共培养培养基 (同 IM+AS+琼脂 15 g/L) 上都不能生长。为了抑制农杆菌以及其他杂菌的生长,共培养蔓枯病菌分生孢子和 C58C1::pBIG2RHPH2 时,培养基内添加 200 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素+200 $\mu\text{g/mL}$ 头孢噻肟钠+200 $\mu\text{g/mL}$ 四环素。

2.2 转化条件的优化组合

对农杆菌悬浮液浓度、共培养时间和 AS 浓度进行优化,结果发现当农杆菌悬浮液的 OD_{600} 为 0.15、共培养时间 48 h (或 36 h)、AS 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ (或 300 $\mu\text{mol/L}$) 时甜瓜蔓枯病菌分生孢子的转化效率最高, 1×10^5 个孢子中能产生 45~52 个转化子,4 个处理之间没有显著性差异 (表 1)。从 3 个因素的结果分析发现,农杆菌的菌量对分生孢子的转化效率影响最大,菌量太低 (OD_{600} 为 0.12),转化效率也较低,但是农杆菌达到一定菌量后 (OD_{600} 为 0.15),浓度再增大 (OD_{600} 为 0.18),转化效率反而总体有下降趋势,这说明菌量太大对分生孢子的转化是不利的。在农杆菌 OD_{600} 为 0.15 时,随着共培养时间的延长,转化效率有所提高,同样的共培养时间,AS 的浓度升高,转化效率也有所增大,但是共培养的时间 48 h 和 36 h 以及 AS 的浓度是 200 $\mu\text{mol/L}$ 或 300 $\mu\text{mol/L}$ 时转化的效率没有显著性差异。这与前人的研究结果是相似的^[12-16]。为了节省工作时间和节省 AS,我们选择当甜瓜蔓枯病菌分生孢子悬浮液浓度 1×10^6 个孢子/mL 时,确定甜瓜蔓枯病菌的最优转化体系为:农杆菌悬浮液 OD_{600} 为 0.15、共培养时间为 48 h、诱导培养基中添加 200 $\mu\text{mol/L}$ AS。

2.3 转化子遗传稳定性的检测

2.3.1 *hph* 基因在甜瓜蔓枯病菌的转化子内稳定复制和转录

研究结果发现 3 个转化子的 *hph* 基因都有扩增条带,这表明 T-DNA 已经插入到甜瓜蔓枯病菌的染色体上,表现出 *hph* 基因在复制和转录水平上的遗传稳定性 (图 2),与前人的报道是吻合的^[15,17-18]。

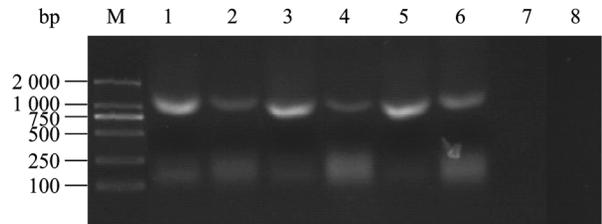


图 2 PCR 和 RT-PCR 验证连续继代 5 次的甜瓜蔓枯病菌转化子的潮霉素 B 磷酸转移酶基因 (*hph*) 的稳定性

Fig. 2 Verificaton by PCR and RT-PCR for hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*) in three transformant of *D. bryoniae* after 5 times of subculture. M: DNA marker; 1, 3, 5: PCR products of the transformants; 2, 4, 6: RT-PCR products of the transformants; 7, 8: the PCR and RT-PCR products of the wild type, respectively.

这将为农杆菌成为甜瓜蔓枯病菌功能基因研究的重要工具提供了可能。

2.3.2 T-DNA 单拷贝插入转化子的几率较高

Southern blotting 研究结果发现每个转化子都只有一条杂交条带,说明 T-DNA 都以单拷贝形式插入蔓枯病菌转化子的染色体 (图 3),这与前人的研究结果相似^[14,19-20]。这说明农杆菌转化甜瓜蔓枯病菌分生孢子建立该病菌的突变体库以及进行该病菌的功能基因研究是可行的。

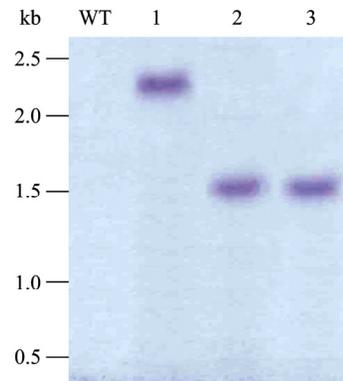


图 3 Southern blotting 验证连续继代 5 次的甜瓜蔓枯病菌转化子的潮霉素 B 磷酸转移酶基因 (*hph*) 的稳定性

Fig. 3 Verificaton by Southern blotting for hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*) in three transformant of *D. bryoniae* after 5 times of subculture. WT: wild type of *D. bryoniae*; 1, 2, 3: the transformants.

3 讨论

与其他转化方法相比,农杆菌转化真菌具有 4 个优点: 1) 农杆菌可以转化完整的细胞,如分生孢子、菌丝、子实体等,这就免去了制备原生质体的

麻烦; 2) 农杆菌转化系统转化效率高, 研究表明农杆菌介导的每 10^7 个丝状真菌细胞一般能产生 300~7 200 个转化子, 比其他真菌转化方法高 100~1 000 倍; 3) 产生的突变体大部分为单拷贝插入突变体, 因此标签基因的分离相对容易; 4) 该方法产生的转化子稳定, 农杆菌可以转化各种形式的受体, 因此当采用具有单核的分生孢子为转化受体时可以得到后代不分离的转化子, 避免了真菌菌丝多核所造成的转化子不稳定的难题^[22]。参考其他真菌的转化方法^[14-16], 本研究对甜瓜蔓枯病菌的转化条件进行了探索, 筛选出最优转化条件, 1×10^5 个分生孢子能得到 45 个左右的转化子, 这与农杆菌转化其他真菌的效率^[14-16] 相比转化效率较高, 这将为甜瓜蔓枯病菌的遗传学以及功能基因的研究提供良好的基础。利用该转化体系我们可以从以下几个方面对甜瓜蔓枯病菌进行研究: 第一, 建立甜瓜蔓枯病菌的 T-DNA 插入突变体库。筛选突变体库, 从突变体菌株的形态、生物学特性以及致病性等方面筛选目标突变体, 克隆甜瓜蔓枯病菌的功能基因。第二, 构建携带异源序列的质粒转化甜瓜蔓枯病菌, 产生插入失活的突变体, 高效快速克隆功能确定的蔓枯病菌的基因。第三, 甜瓜蔓枯病菌的基因功能验证。将目标基因的部分序列克隆至 T-DNA 左右边界内侧, 然后进行转化就可以实现目标基因以同源重组的方式敲除, 可根据表型确定该基因的功能。第四, 改造甜瓜蔓枯病菌, 利用携带有某一特定基因的外源质粒转化受体菌株, 使其成为植物的“疫苗”, 在葫芦科植物蔓枯病的防治中发挥重要的作用。

致谢: 在此特别感谢 Shaobin Zhong 博士 (Department of Plant Pathology, North Dakota State University, USA) 给予实验方法的指导和对英文的润饰。

REFERENCES

- [1] Li W, Zhang AX, Jiang J, *et al.* Identification of muskmelon gummy stem blight pathogen and its biological characters. *Jiangsu J Agri Sci*, 2008, **24**(2): 148-152.
李伟, 张爱香, 江蛟, 等. 甜瓜蔓枯病原鉴定及其生物学特性. *江苏农业学报*, 2008, **24**(2): 148-152.
- [2] Zhang CF, Gu LS, Shen F. Integrated control techniques of “Haimi melon”. *Shanghai Agri Technol*, 2001, **6**: 64-65.
张乘风, 顾立生, 沈飞. “海蜜甜瓜”蔓枯病综防技术. *上海农业科技*, 2001, **6**: 64-65.
- [3] Lü PK, Liu WZ, Duan BS, *et al.* The Continuation of Atlas of Insect Pests and Diseases of Vegetable Crops in China. Huhhot: Yuan Fang Publishing Company, 1996: 86-87.
吕佩珂, 刘文珍, 段半锁, 等. 中国蔬菜病虫害原色图谱续集. 呼和浩特: 远方出版社, 1996: 86-87.
- [4] Somai BM, Dean RA, Farnham MW, *et al.* Internal transcribed spacer region 1 and 2 and random amplified polymorphic DNA analysis of *Didymella bryoniae* and related *Phoma* species is isolated from cucurbits. *Phytopathology*, 2002, **92**(9): 997-1004.
- [5] Kothera RT, Keinath AP, Dean RA, *et al.* AFLP analysis of a worldwide collection of *Didymella bryoniae*. *Mycol Res*, 2003, **107**(3): 297-304.
- [6] Jiang J, Chen HG, Yang XP, *et al.* Selection for fungicides to control melon stem blight disease. *J Changjiang Veget*, 2007, **11**: 48-49.
江蛟, 陈怀谷, 羊杏平, 等. 甜瓜蔓枯病的防治药剂筛选试验. *长江蔬菜*, 2007, **11**: 48-49.
- [7] Frantz JD, Jahn MM. Five independent loci each control monogenic resistance to gummy stem blight in melon (*Cucumis melo* L.). *Theo App Genet*, 2004, **108**(6): 1033-1038.
- [8] Zhou XH, Li Y, Zhang YB, *et al.* Screening and RAPD analysis of gummy stem blight resistance in melon germplasm. *Acta Hort Sin*, 2007, **34**(5): 1201-1206.
周晓慧, 李英, 张永兵, 等. 甜瓜抗蔓枯病种质资源的筛选及 RAPD 分析. *园艺学报*, 2007, **34**(5): 1201-1206.
- [9] Xiang YB, Liang ZQ, Gao MW, *et al.* *Agrobacterium* mediated transformation of insecticidal *Bacillus thuringiensis* cryIA (b) and cryIA (c) genes and their expression in rice. *Chin J Biotech*, 1999, **15**(4): 494-500.
项友斌, 梁竹青, 高明尉, 等. 农杆菌介导的苏云金杆菌抗虫基因 cryIA (b) 和 cryIA (c) 在水稻中的遗传转化及蛋白表达. *生物工程学报*, 1999, **15**(4): 494-500.
- [10] Lin SZ, Cao YP, Wei ZM. Genetic transformation of soybean mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Chin J Biotech*, 2004, **20**(6): 817-820.
林树柱, 曹越平, 卫志明. 根癌农杆菌介导的大豆遗传转化. *生物工程学报*, 2004, **20**(6): 817-820.
- [11] Zhang MZ, Tang Q, Chen ZL, *et al.* Genetic transformation of *Bt* gene into sorghum (*Sorghum bicolor* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Chin J*

- Biotech*, 2009, **25**(3): 418–423.
张明洲, 唐乔, 陈宗伦, 等. 农杆菌介导 *Bt* 基因遗传转化高粱. 生物工程学报, 2009, **25**(3): 418–423.
- [12] Talhinhas P, Muthumeenakshi S, Neves-Martins J, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation and insertional mutagenesis in *Colletotrichum acutatum* for investigating varied pathogenicity lifestyles. *Mol Biotechnol*, 2008, **39**(1): 57–67.
- [13] Wu YX, Fan CM, Zhou HP, *et al.* A genetic of transformation of *Magnaporthe grisea* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Phytophyl Sin*, 2008, **35**(5): 421–426.
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. 植物保护学报, 2008, **35**(5): 421–426.
- [14] Mullins ED, Chen X, Romaine P, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 2001, **91**(2): 173–180.
- [15] Duarte RT, Staats CC, Fungaro MH, *et al.* Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Lett Appl Microbiol*, 2007, **44**(3): 248–254.
- [16] Choi J, Park J, Jeon J, *et al.* Genome-wide analysis of T-DNA integration into the chromosomes of *Magnaporthe oryzae*. *Mol Microbiol*, 2007, **66**: 371–382.
- [17] Fang W, Pei Y, Bidochka MJ. Transformation of *Metarhizium anisopliae* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Can J Microbiol*, 2006, **52**(7): 623–626.
- [18] Yang YJ, Lee I. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Monascus ruber*. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, **18**(4): 754–758.
- [19] Mata MM, Taniwaki MH, Iamanaka BT, *et al.* *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*. *Can J Microbiol*, 2007, **53**(1): 148–151.
- [20] Maruthachalam K, Nair V, Rho HS, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, **18**(2): 234–241.
- [21] Ren HY, Fang L, Ru SJ, *et al.* A preliminary investigation of a mutant melon plant *edr2* on resistance to gummy stem blight. *Sci Agri Sin*, 2009, **42**(9): 3131–3138.
任海英, 方丽, 茹水江, 等. 抗蔓枯病甜瓜突变体 *edr2* 抗病现象的初步研究. 中国农业科学, 2009, **42**(9): 3131–3138.
- [22] Huang YL, Ye J, Jiang XL, *et al.* Advance in genetic transformation system of fungi. *Microbiol China*, 2007, **34**(6): 1213–1217.
黄亚丽, 叶婧, 蒋细良, 等. 真菌遗传转化系统的研究进展. 微生物学通报, 2007, **34**(6): 1213–1217.