

简 报

青色荧光蛋白标记的禾谷镰孢转化子的构建

许苗苗¹ 苏前富² 李丽娜¹ 渠清¹ 贾娇² 曹志艳^{1*} 董金皋^{1*}

(1. 河北农业大学 河北省植物生理与分子病理学重点实验室 河北 保定 071000)

(2. 吉林省农业科学研究院植物保护研究所 吉林 长春 130033)

摘 要:【背景】近年来玉米茎腐病在我国大部分玉米产区普遍重度发生,其中镰孢菌茎腐病不仅造成了重大的经济损失,而且镰孢菌产生的毒素给人体和动物的健康也带来严重威胁。【目的】玉米茎腐病的病原组成复杂,禾谷镰孢是其中的主要病原之一,该病原菌侵染寄主导致发病的机制急需深入研究。【方法】以 pCambia1300 质粒为骨架,利用重叠 PCR 的方法构建表达青色荧光蛋白的质粒 pCambia1300-CFP-Kan,通过农杆菌介导的遗传转化技术,将青色荧光蛋白的编码基因整合到禾谷镰孢基因组中。【结果】经过 PCR 鉴定和荧光显微观察,确定获得了 31 株青色荧光标记的禾谷镰孢菌。【结论】侵染试验结果显示,激光共聚焦显微镜下禾谷镰孢在玉米茎秆组织中的定殖位置清晰可见,该结果为进一步研究不同镰孢菌在寄主中的定殖规律奠定了基础。

关键词: 青色荧光蛋白, 重叠 PCR, 禾谷镰孢, 侵染

Construction of CFP-labeled *Fusarium graminearum* transformantsXU Miao-Miao¹ SU Qian-Fu² LI Li-Na¹ QU Qing¹ JIA Jiao²
CAO Zhi-Yan^{1*} DONG Jin-Gao^{1*}

(1. Key Laboratory of Hebei Province for Molecular Plant-Microbe Interaction, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000, China)

(2. Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130033, China)

Abstract: [Background] In recent years, maize stalk rot occurs widely and seriously in most corn-growing areas in China. *Fusarium* stalk rot not only causes an important economic loss of corn, but also is a serious threat to human and animal health because of the toxins produced by *Fusarium* species. [Objective] Among the complicated pathogenic fungi of corn stalk rot, *Fusarium graminearum* is one of the major pathogens. The infection mechanism of *F. graminearum* still remains an urgent research topic. [Methods] The plasmid pCambia1300 was taken as the backbone, and the plasmid pCambia1300-CFP-Kan, expressing the cyan fluorescent protein, was constructed using the overlapping PCR. Then the CFP gene was transformed to the genome of *F.*

Foundation item: China Agriculture Research System (CARS-02)

***Corresponding authors:** E-mail: CAO Zhi-Yan: caoyan208@126.com; DONG Jin-Gao: dongjingao@126.com

Received: April 10, 2018; **Accepted:** June 01, 2018; **Published online** (www.cnki.net): July 17, 2018

基金项目: 国家现代农业(玉米)产业技术体系(CARS-02)

***通信作者:** E-mail: 曹志艳: caoyan208@126.com; 董金皋: dongjingao@126.com

收稿日期: 2018-04-10; **接受日期:** 2018-06-01; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-07-17

graminearum by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation technology. [Results] After PCR identification and fluorescence microscopy, 31 strains labeled with CFP were acquired. [Conclusion] The pathogenicity test results suggested that *F. graminearum* successfully colonized in corn tissue under laser confocal observation. These results lay a solid foundation for study of the colonization of *Fusarium* species.

Keywords: Cyan fluorescent protein, Overlapping PCR, *Fusarium graminearum*, Infection

玉米茎腐病, 又称为玉米茎基腐病, 常侵染玉米茎秆基部, 从而导致茎组织变软变褐和果穗倒挂, 减产严重, 并影响机械化收获。玉米茎腐病的致病菌十分复杂, 通常是多种病原菌复合侵染。另外, 其病原组成又因地区差异和气候条件变化, 导致不同地区不同年份间茎腐病的病原组成也不相同^[1]。目前, 已知引起玉米茎腐病的主要致病菌主要包括禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)、拟轮枝镰孢(*F. verticillioides*)、尖孢镰孢(*F. oxysporum*)等。其中禾谷镰孢侵染玉米茎部会导致茎髓部腐烂, 并且在被感染的玉米秸秆上产生毒素^[2]。对于该病的防治目前尚无有效的方法, 主要归因于病原菌组成复杂, 不同镰孢菌在玉米茎部侵染、定殖规律不清楚。据文献报道, 应用荧光标记菌株可观测致病菌在寄主体内的侵染定殖情况^[3-4]。如 Santiago 等^[5]采用绿色荧光标记的炭疽病菌, 观察致病菌在玉米根系的侵染过程, 研究发现接种 1 d 后菌丝定殖胚根表面; 2 d 时菌丝沿着表皮生长, 平行于根部的纵向轴线; 在 3 d 时可观察到部分菌丝侵入根表皮细胞的细胞间隙。Haile 等^[6]通过荧光观察 GFP 标记的灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)在葡萄开花期的侵染过程, 确定了病菌的定殖部位, 进而检测接种后不同时间寄主与病菌在转录和代谢水平上的变化, 揭示了宿主与病菌间的互作关系。凌瑶^[7]研究表明, 使用 CFP 荧光标记技术可研究菜豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)的竞争结瘤能力。

丝状真菌的荧光报告基因标记技术能够在细胞和全植物水平上监测真菌的生长和发育, 这种技术对于非破坏性和原位观察致病真菌与其宿主之间复杂的相互作用特别有吸引力^[8]。绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)已广泛应用于多种

细菌、真菌、植物和哺乳动物细胞的研究中, 目前已为多种植物致病真菌在植物体外和体内中的观察提供了有效工具^[9-10]。Heim 等早在 1994 年就率先阐述了 GFP 发光的化学机制^[11], 于 1995 年通过单点突变(S65T)技术获得了荧光强度和光稳定性大大增强的 GFP 突变体(GFP-S65T), 并进一步获得了蓝色荧光蛋白(Blue fluorescent protein, BFP)、青色荧光蛋白(Cyan fluorescent protein, CFP)和黄色荧光蛋白(Yellow fluorescent protein, YFP)^[12]。青色荧光蛋白的编码基因 *CFP* 在宿主细胞表达后, 对细胞本身没有任何损伤, 反应过程也无需底物, 能产生更明亮的蓝-绿色或青色荧光^[13]。

为了将外源荧光蛋白基因成功导入目标真菌基因组中, 高效的遗传转化系统必不可少。Bundock 等^[14]首次将 ATMT 技术应用于研究酵母菌, 而后得到广泛应用, 并已应用于病原真菌突变体库的构建和功能基因组学的研究中。目前, 丝状真菌如日本曲霉(*Aspergillus japonicus*)^[15]、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)^[16]、青霉菌(*Penicillium*)^[17]、炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)^[18]和轮枝菌(*Verticillium dahliae*)^[19]等的 ATMT 遗传转化技术体系已成熟。

近几年, 关于玉米茎腐病的防控研究备受关注, 但对玉米茎腐病病原菌的侵染机制还缺乏深入了解。本课题组前期获得了带有绿色荧光蛋白(GFP)和红色荧光蛋白(RFP)标记的层出镰孢(*F. proliferatum*)和拟轮枝镰孢(*F. verticillioides*)。在此基础上, 本研究拟通过 ATMT 技术构建青色荧光标记的禾谷镰孢, 为寄主与病原菌间的互作研究以及不同镰孢菌侵染寄主过程中的竞争机制研究提供一种直观的、非破坏性的技术, 为病原菌在寄主体内的定殖规律

研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试玉米品种、菌株及质粒

供试玉米 B73, 河北省植物生理与分子病理学重点实验室保存。

供试菌株禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)由吉林省农业科学研究院植物保护研究所苏前富博士提供。农杆菌 AGL-1 来自河北省植物生理与分子病理学重点实验室。

供试质粒 pBSK-CFP-Kan, 含有青色荧光蛋白基因, 用于扩增目的片段, 由河北省植物生理与分子病理学重点实验室保存; 质粒 pCAMBIA1300, 含有卡那抗性和潮霉素抗性, 适用于农杆菌介导的遗传转化, 由上海交通大学农业与生物学院陈捷教授惠赠。

1.2 供试培养基

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂粉 13.0。

CMC 培养基(g/L): NH_4NO_3 1.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 酵母浸粉 1.0, 羧甲基硝酸纤维素钠 15.0。

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。调节 pH 7.0。固体培养基加琼脂粉 15.0 g/L。

YEB 液体培养基(g/L): 蔗糖 5.0, 胰蛋白胨 5.0, 牛肉浸膏抽浸膏 5.0, 酵母提取物 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 调 pH 7.2–7.4。固体培养基加琼脂粉 15.0 g/L。

IM 诱导培养基: 10.0 mL K-buffer, 20.0 mL M-N, 1.0 mL 1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (质量体积比), 10.0 mL 0.01% FeSO_4 (质量体积比), 5.0 mL Spore Elements, 2.5 mL 20% NH_4NO_3 (质量体积比), 10.0 mL 50% 甘油, 40.0 mL 1 mol/L MES (pH 5.3), 5.0 mL 2 mol/L 葡萄糖, 2.0 mL 100 mmol/L 乙酰丁香酮(AS), 加 ddH_2O 898.7 mL 至 1 L。

IM 共培养固体培养基 IM 诱导培养基加 15.0 g/L 琼脂粉, 其中 2 mol/L 葡萄糖改为 2.5 mL/L。

K-buffer (g/L): K_2HPO_4 200.0, KH_2PO_4 145.0, 调节 pH 7.0; M-N (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30.0, NaCl 15.0; Spore Elements: 100.0 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100.0 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100.0 mg/L H_3BO_3 , 100.0 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100.0 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

1.3 主要试剂和仪器

羧甲基纤维素钠、头孢噻肟钠、卡那霉素、氨苄青霉素、乙酰丁香酮, 生工生物工程(上海)股份有限公司; LATaq DNA 聚合酶、dNTPs、限制性内切酶 *Sma* I, 宝生物工程(大连)有限公司; DL2000、DL10000 DNA marker, 上海捷瑞生物科技有限公司; 潮霉素 B, Roche 公司; 硝酸纤维素膜, Whatman 公司; 葡萄糖、平衡酚、胰蛋白胨、氯仿、异丙醇、无水乙醇、琼脂粉、酵母浸粉等常用分析纯, BBI 生命科学有限公司。

高压蒸汽灭菌锅, 厦门致微仪器有限公司; EasyCycler PCR 仪, 耶拿分析仪器股份公司; 全自动凝胶成像仪, 北京赛创科技有限公司; 智能生化培养箱, 宁波江南仪器厂; 光学显微镜、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜, 奥林巴斯公司; 高速冷冻离心机, 贺利氏控股集团公司。

1.4 带有青色荧光的 ATMT 转化载体的构建

基于目前本实验室尚无携带青色荧光且适用于真菌 ATMT 转化的质粒载体, 本研究首先对现有质粒 pBSK-CFP-Kan 和 pCAMBIA1300-eGFP-Kan 进行改造。应用重叠 PCR 的方法, 以 pBSK-CFP-Kan 为模板扩增 CFP 基因, 以 pCAMBIA1300-eGFP-Kan 为模板扩增启动子 *trpC* 和 Z 序列(载体序列, 从 CFP 终止子到 *Sma* I 酶切位点的序列), PCR 扩增所用引物见表 1。PCR 反应体系(25 μL): 模板 DNA 1 μL , 引物 10 $\mu\text{mol/L}$ 各 0.5 μL , 10 \times Taq buffer (Mg^{2+} Plus) 2.5 μL , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μL , TaKaRa Taq 酶(5 U/ μL) 0.5 μL , ddH_2O 18 μL 。反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 55 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1–2 min, 35 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收, 纯化后测序。之后用 *Sma* I 单酶切

表 1 PCR 引物

Table 1 Primers used for PCR

引物 Primers	序列 Sequence (5'→3')	大小 Size (bp)
TrpC-F	CCCGGGACCTCAAAGGAGGAGGGG GGTCCCC	449
TrpC-R	GGTGGCGAGCTCGGTACCTAAGTTC TTCTCCTTTACTCAT	
CFP-F	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTAGGT ACCGAGCTCGCCAC	726
CFP-R	GGTCAAGCATGCAGGCCTCTCTAGG ATCTACCTTTGTATA	
Z-F	TATACAAAGGTAGATCCTAGAGAGG CCTGCATGCTTGACC	1 431
Z-R	CCCGGGCGGGTTTTTCGAGTCGTTTTT GTCAC	

质粒 pCAMBIA1300-eGFP-Kan, 回收质粒序列与测序正确的目的片段进行连接, 再转入大肠杆菌感受态中, 将转化后的大肠杆菌均匀涂布于含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素抗性的 LB 平板上培养过夜, 挑取单克隆 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养 4 h, 再进行菌液检测, 提取阳性菌液质粒 pCAMBIA1300-CFP-Kan, 同样用 *Sma* I 进行酶切验证。

1.5 农杆菌介导的遗传转化

(1) 取 200 μL 农杆菌 AGL-1 感受态细胞, 加入 10 μL 重组质粒 pCAMBIA1300-CFP-Kan 后冰浴热击转化, 然后加入 600 μL YEB 液体培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 恒温振荡培养 6 h。之后取 50 μL 菌液均匀涂布于含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 YEB 平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d 后挑取单克隆, 进行菌液检测。取阳性克隆的菌液进行活化, 然后多次离心收集菌体, 加入 IM 诱导培养基调整菌液 OD_{600} 为 0.15–0.20 左右, 再加入终浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$ 的乙酰丁香酮(AS)对农杆菌进行预培养, 待菌体 OD_{600} 值为 0.8–1.0 时取出, 以备转化用^[20]。

(2) 将禾谷镰孢接种于 CMC 液体培养基中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 7 d, 制备 $10^6/\text{mL}$ 的孢子悬浮液。

(3) 在含乙酰丁香酮(AS)浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 的

共培养 IM 平板上铺一层硝酸纤维素膜, 将 100 μL 禾谷镰孢孢子悬浮液与 100 μL 农杆菌培养物 (OD_{600} 为 0.8–1.0)混合均匀, 涂布于 IM 平板上 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养 5–10 d。将含有培养物的硝酸纤维素膜转移至 PDA 选择培养基(含 0.2 mol/L 头孢噻肟钠和 100 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素)上, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养 4–6 d 后挑取生长的菌落, 继续接种到选择培养基上培养, 连续进行 5 轮, 将得到的潮霉素抗性转化子进行纯化。

1.6 禾谷镰孢 CFP 转化子的鉴定

1.6.1 转化子的 PCR 验证

将获得的潮霉素抗性转化子接种于 PDA 培养基上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养 7 d, 然后轻轻刮取表面菌丝, 按常规十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)方法提取野生型及转化子的基因组 DNA^[21], 转化子 *CFP* 基因的验证参照质粒构建的引物进行扩增, 1%琼脂糖凝胶电泳检测目的片段。

1.6.2 转化子的荧光显微验证

取生长在 PDA 培养基上的菌丝, 在接种点旁倾斜 45 $^{\circ}$ 插入灭菌后的盖玻片, 黑暗倒置培养 3 d 后, 取出盖玻片, 在载玻片上滴一滴无菌水, 轻轻从一侧盖上盖玻片, 赶走气泡制成菌丝切片, 在荧光显微镜下观察其荧光信号。

1.7 禾谷镰孢在玉米茎部的定殖观察

选取经分子鉴定已经转入目的基因且荧光观察有较强信号的禾谷镰孢青色荧光转化子, 将其在 CMC 培养基中 25 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 7 d, 过滤洗涤得到孢子悬液后调整浓度至 $10^6/\text{mL}$, 在玉米茎部第二节注射 2 mL 孢子悬浮液, 接种无菌水为空白对照。接种后在伤口部位包扎灭菌纱布后按常规方法管理。于接种后 4 d 取样, 之后将茎秆从中心纵向劈开, 用超薄切片刀切取适量茎部组织放于载玻片上, 滴加无菌水, 迅速盖上盖玻片, 尽量除去气泡, 将制作好的玻片样品置于激光共聚焦显微镜下观察禾谷镰孢在茎部组织的定殖情况。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pCAMBIA1300-CFP-Kan 载体的获得

利用 3 对引物 *trpC*-F/R、*CFP*-F/R 和 *Z*-F/R, 分别扩增出启动子、青色荧光蛋白和 *Z* 序列目的片段(图 1-3)。然后, 利用重叠 PCR 方法将 3 个基因片段融合成 1 个长片段(图 4), PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶检测结果显示, 获得的目的片段大小与预期一致, 证明已获得了 CFP 蛋白的表达框。酶切验证结果(图 5A)显示, 目的片段大小正确, 表明已将目的基因连接到载体上, 青色荧光标记的质粒载体构建成功(图 5B)。

2.2 转化子的分子鉴定

分别以重组质粒 pCAMBIA1300-CFP-Kan、禾谷镰孢野生型菌株 DNA 和转化子 DNA 为模板, 用引物 *CFP*-F/*CFP*-R 进行 PCR 扩增, 检测是否含有青色荧光基因片段。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 阳性对照质粒有明亮的目的条带, 而野生型菌株未能扩增到目的条带, 大部分转化子能够扩增获得 726 bp 的预期条带(图 6)。由此初步确定 pCAMBIA1300-CFP-Kan 载体中的 *CFP* 基因通过 ATMT 转化, 成功地整合到野生型菌株的基因组中。

2.3 转化子的荧光鉴定

将 PCR 鉴定为阳性的转化子进行荧光显微镜观察, 选取在普通 PDA 培养基上生长的转化子和野

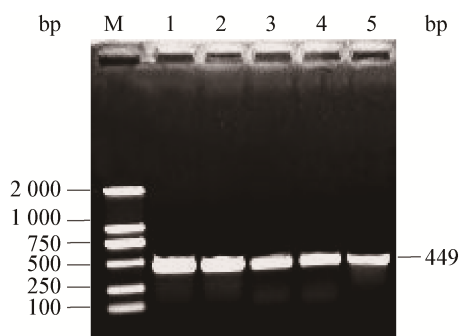


图 1 启动子 *trpC* 基因的 PCR 结果

Figure 1 Detection of PCR amplification of promoter *trpC*

注: M: DL2000 DNA marker; 1-5: 样品.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-5: Samples.

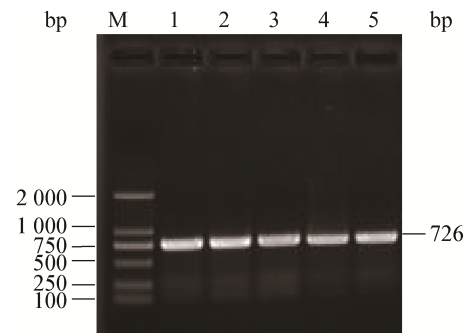


图 2 荧光蛋白基因 *CFP* 的 PCR 结果

Figure 2 Detection of PCR amplification of *CFP*

注: M: DL2000 DNA marker; 1-5: 样品.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-5: Samples.

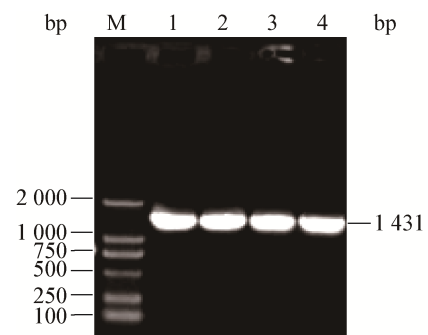


图 3 *Z* 序列片段的 PCR 结果

Figure 3 Detection of PCR amplification of *Z* sequence

注: M: DL2000 DNA marker; 1-4: 样品.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-4: Samples.

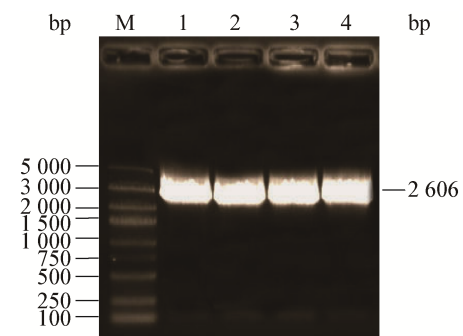


图 4 重叠 PCR 结果

Figure 4 Detection of overlapping PCR

注: M: DL5000 DNA marker; 1-4: 样品.

Note: M: DL5000 DNA marker; 1-4: Samples.

生型菌株的幼嫩菌丝, 于荧光显微镜下观察各个转化子荧光信号的强弱, 为避免成团的菌丝自发荧光, 观察时选取少量菌丝或单根菌丝。结果显示, PCR 鉴定为阳性的转化子菌丝有稳定的青色荧光信号(图 7), 证明菌株已被成功标记。

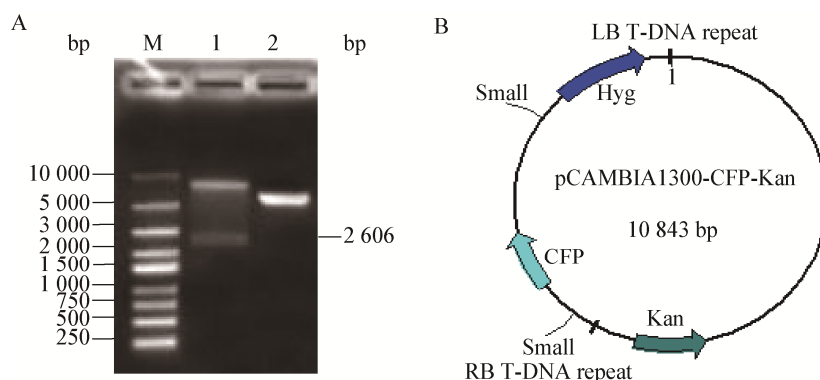


图5 重组质粒的酶切验证(A)和重组质粒图谱(B)

Figure 5 The enzyme digestion pattern (A) and DNA map of recombinant vector (B)

注: M: DL10000 DNA marker; 1: 重组质粒酶切; 2: 质粒对照.

Note: M: DL10000 DNA marker; 1: Recombinant plasmid digest product; 2: Plasmid control.

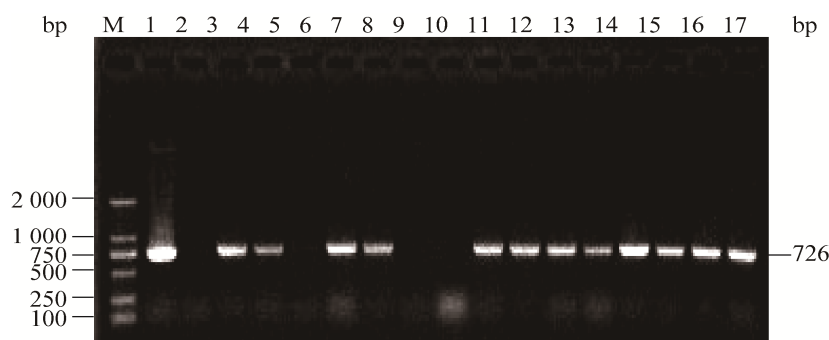


图6 CFP 标记基因转化子的PCR 鉴定

Figure 6 PCR identification of CFP transformants

注: M: DL2000 DNA marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3-17: 转化子.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: Positive control; 2: Negative control; 3-17: Transformants.

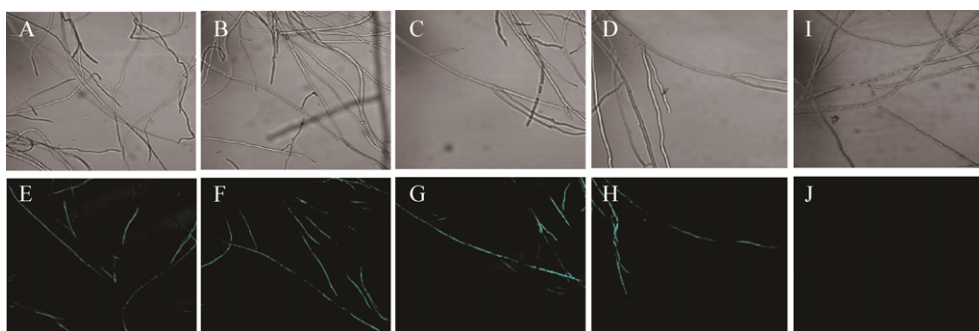


图7 禾谷镰孢青色荧光转化子的荧光显微检测

Figure 7 Fluorescent detection of *Fusarium graminearum* transformants

注: A-D: 转化子的显微观察; E-H: 转化子的荧光观察; I: 野生型的显微观察; J: 野生型的荧光观察.

Note: A-D: Microscopic observation of transformants; E-H: Fluorescence observation of transformants; I: Microscopic observation of wild type; J: Fluorescence observation of wild type.

2.4 禾谷镰孢在玉米茎部的定殖

将 CFP 标记的镰孢菌接种到玉米茎部取样观察发现, 接种镰孢菌的处理出现了明显发病症状, 接种部位组织变褐坏死, 而接种无菌水的处理无明

显变化(图 8A、B)。选取接种部位临近的细胞组织制成切片, 使用激光共聚焦显微镜观察接种的玉米茎部组织, 结果发现, 自然光下可见菌丝在玉米茎部细胞和细胞间隙定殖, 荧光激发下清楚地显示出

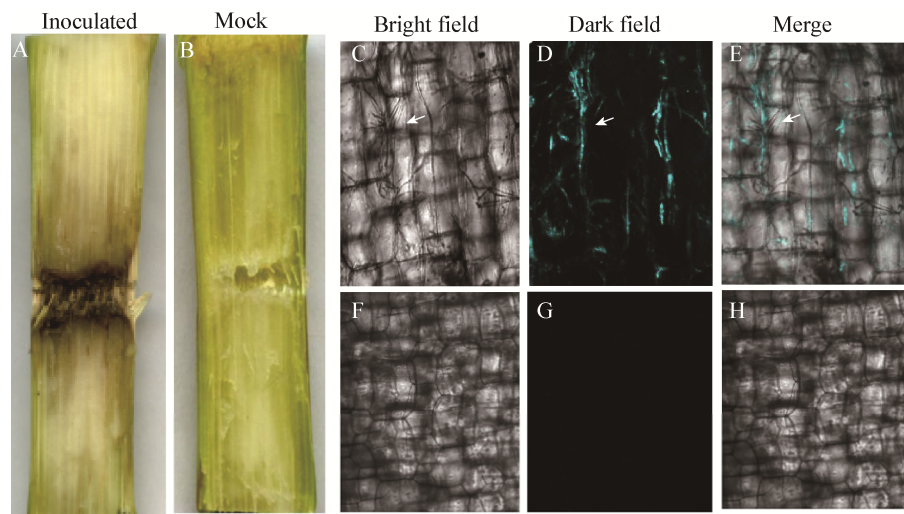


图 8 禾谷镰孢青色荧光转化子接种玉米茎部的荧光观察

Figure 8 Fluorescent observation of *Fusarium graminearum* transformants growing in corn stem tissues

注：A：茎部接种禾谷镰孢转化子；B：茎部接种无菌水；C：茎部接种禾谷镰孢转化子的显微观察；D：茎部接种禾谷镰孢转化子的荧光观察；E：茎部接种禾谷镰孢转化子的明暗场重叠图；F：茎部接种无菌水的显微观察；G：茎部接种无菌水的荧光观察；H：茎部接种无菌水的明暗场重叠图。

Note: A: Stem inoculated *Fusarium graminearum* transformants; B: Stem inoculated with sterile water; C: Microscopic observation of stem inoculated *Fusarium graminearum* transformants; D: Fluorescence observation of stem inoculated *Fusarium graminearum* transformants; E: Merge field of observation of stem inoculated *Fusarium graminearum* transformants; F: Microscopic observation of stem inoculated with sterile water; G: Fluorescence observation of stem inoculated with sterile water; H: Merge field of observation of stem inoculated with sterile water.

青色菌丝的定殖位置，接种无菌水的对照没有明显现象(图 8C、H)。上述结果证明，青色荧光标记的禾谷镰孢菌已成功在玉米茎部组织中定殖，同时也说明 CFP 标记的转化子致病力没有受到影响，而且很好地显示了菌丝在玉米茎部的侵染部位。

3 讨论与结论

由镰孢菌侵染引起的玉米茎腐病给玉米生产构成了严重威胁，一般发病年份导致减产 20%，严重时可减产 50%–60%^[22]。植株在玉米生长后期感病时可见叶片迅速枯萎，茎基部节位变软变空，果穗倒挂，植株容易倒伏，直接影响玉米产量和品质。目前，由于缺少抗病品种和高效的防控药剂，该病尚无有效的防治方法。

通过荧光标记菌株来探讨病原菌侵染途径、定殖规律和解析侵染机制的研究越来越多，GFP 和 DsRed 已被广泛应用于荧光标记的研究中，同时已有文献报道 CFP 在细菌中可以表现明亮的荧光信

号^[7]。例如，许有娣等^[23]将稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)进行了绿色荧光标记，观察稻瘟病菌在高抗水稻和易感水稻中的侵染过程，发现侵染过程的差异主要表现在侵染钉的穿透和侵染菌丝的定殖上。Mrosk 等^[24]以含有 DsRed 的载体转化菌根真菌(*Mycorrhizal fungi*)，追踪了标记菌株在植物茎叶和根中的定殖情况。Vu 等^[25]用农杆菌介导的遗传转化技术用 GFP 和 DsRed 标记了青霉菌(*Penicillium*)，通过荧光观察到青霉菌在柑橘上的侵染过程，发现 GFP 比 DsRed 更适用于青霉菌的侵染过程观察。玉米镰孢茎腐病病原组成复杂，常为多种镰孢菌或其他病菌复合侵染，在侵染过程是以某个镰孢菌为主还是不同镰孢菌间存在协同作用或竞争关系，目前尚不清楚。本研究利用重叠 PCR 的方法成功构建了青色荧光蛋白 CFP 的质粒载体，该方法避免了试验过程中基于酶切位点选择而带来的不便，而且对原有质粒没有造成过多的改变，荧光信号表达稳定。试验中使用的启动子在真菌中能够稳定启动，

保证了所插入目的基因的表达效果与原有基因表达效果一致。凌瑶^[7]通过三亲本杂交方法将细菌供体中的 *CFP* 基因转给受体细菌,而禾谷镰孢属于真核生物,要将质粒中携带的 *CFP* 基因转入真菌基因组中必须借助媒介,ATMT 技术是目前研究中采用的最常用最有效的方法。在此基础上,本研究通过实验室前期建立的层出镰孢 ATMT 转化体系^[26],将 *CFP* 基因整合到禾谷镰孢基因组中,通过荧光检测,获得了 CFP 蛋白的表达。本文研究结果为进一步深入了解禾谷镰孢病菌在玉米茎部的侵染定殖规律奠定了坚实基础,同时可以为多种镰孢菌在侵染过程中的互作关系研究提供材料。

REFERENCES

- [1] Ma HX, Zhang HJ, Sun H, et al. Comparison of pathogen detection methods for corn stalk rot[J]. Plant Protection, 2017, 43(3): 149-153 (in Chinese)
马红霞, 张海剑, 孙华, 等. 玉米茎腐病原菌检测方法研究[J]. 植物保护, 2017, 43(3): 149-153
- [2] Quesada-Ocampo LM, Al-Haddad J, Scruggs AC, et al. Susceptibility of maize to stalk rot caused by *Fusarium graminearum* deoxynivalenol and zearalenone mutants[J]. Postharvest Pathology and Mycotoxins, 2016, 106(8): 920-927
- [3] Palencia ER, Glenn AE, Hinton DM, et al. Constitutive expression of fluorescent protein by *Aspergillus* var. *niger* and *Aspergillus carbonarius* to monitor fungal colonization in maize plants[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 94(3): 381-389
- [4] Islam MN, Nizam S, Verma PK. A highly efficient *Agrobacterium* mediated transformation system for chickpea wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* using DsRed-Express to follow root colonisation[J]. Microbiological Research, 2012, 167(6): 332-338
- [5] Santiago R, Reid LM, Arnason JT, et al. Phenolics in maize genotypes differing in susceptibility to *Gibberella* stalk rot (*Fusarium graminearum* schwabe)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(13): 5186-5193
- [6] Haile ZM, Pilati S, Sonogo P, et al. Molecular analysis of the early interaction between the grapevine flower and *Botrytis cinerea* reveals that prompt activation of specific host pathways leads to fungus quiescence[J]. Plant, Cell & Environment, 2017, 40(8): 1409-1428
- [7] Ling Y. The competitiveness and effectiveness of *Phaseolus rhizobia* studied by using CFP marker gene technique[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2005 (in Chinese)
凌瑶. 用 CFP 标记基因法研究菜豆根瘤菌的竞争性和有效性 [D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2005
- [8] Larrainzar E, O'Gara F, Morrissey JP, et al. Applications of autofluorescent proteins for in situ studies in microbial ecology[J]. Annual Review of Microbiology, 2005, 59(1): 257-277
- [9] Lorang JM, Tuori RP, Martinez JP, et al. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 1987-1994
- [10] da Silva Siqueira C, da Cruz Machado J, Corrêa CL, et al. Colonization of maize seeds by two species of *Stenocarpella* transformed with fluorescent proteins and assessed through scanning electron microscopy[J]. Journal of Seed Science, 2014, 36(2): 168-177
- [11] Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(26): 12501-12504
- [12] Heim R, Tsien RY. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer[J]. Current Biology, 1996, 6(2): 178-182
- [13] Yang J, Zhang ZH, Luo QM. Recent progress in fluorescent proteins research[J]. Acta Biophysica Sinica, 2010, 26(11): 1025-1035 (in Chinese)
杨杰, 张智红, 骆清铭. 荧光蛋白研究进展[J]. 生物物理学报, 2010, 26(11): 1025-1035
- [14] Bundock P, Den Dulk-Ras A, Beijersbergen A, et al. Trans-kingdom T-DNA Transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. The EMBO Journal, 1995, 14(13): 3206-3214
- [15] Guo H, Yang Z, Xing LJ, et al. Transformation system of *Aspergillus japonicus* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(1): 115-121 (in Chinese)
郭慧, 杨哲, 邢来君, 等. 根瘤农杆菌介导的日本曲霉转化体系的建立[J]. 微生物学报, 2011, 51(1): 115-121
- [16] Michielse CB, Hooykaas PJJ, van den Hondel CAMJJ, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. Current Genetics, 2005, 48(1): 1-17
- [17] Wang JY, Li HY. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2008, 9(10): 823-828
- [18] Cai ZY, Li GH, Lin CH, et al. Identifying pathogenicity genes in the rubber tree anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides* through random insertional mutagenesis[J]. Microbiological Research, 2013, 168(6): 340-350
- [19] Maruthachalam K, Klosterman SJ, Kang S, et al. Identification of pathogenicity-related genes in the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated T-DNA insertional mutagenesis[J]. Molecular Biotechnology, 2011, 49(3): 209-221
- [20] Maruthachalam K, Nair V, Rho HS, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(2): 234-241
- [21] An XL, Dong JG, Han JM. RAPD analysis of *Exserohilum turcicum* I. CTAB method of isolating DNA from *Exserohilum turcicum* for RAPD[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2001, 24(1): 38-41 (in Chinese)

- 安鑫龙, 董金皋, 韩建民. 玉米大斑病菌的 RAPD 分析 I. 应用 CTAB 法提取玉米大斑病菌 DNA[J]. 河北农业大学学报, 2001, 24(1): 38-41
- [22] Cui XW. Study on corn stalk rot in Henan province[D]. Shaanxi: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2013 (in Chinese)
- 崔小伟. 河南省玉米茎腐病研究[D]. 陕西: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2013
- [23] Xu YP, Liao HC, Chen JH, et al. Fluorescent microscopic analysis of the plant infection process of *Magnaporthe oryzae* using green fluorescent protein[J]. Plant Protection, 2017, 43(6): 53-61 (in Chinese)
- 许有斌, 廖海澄, 陈金华, 等. 利用绿色荧光蛋白 GFP 研究稻瘟病菌与水稻的互作[J]. 植物保护, 2017, 43(6): 53-61
- [24] Mrosk C, Forner S, Hause G, et al. Composite *Medicago truncatula* plants harbouring *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots reveal normal mycorrhization by *Glomus intraradices*[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(13): 3797-3807
- [25] Vu TX, Ngo TT, Mai LTD, et al. A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using DsRed and GFP to visualize citrus host colonization[J]. Journal of Microbiological Methods, 2018, 144: 134-144
- [26] Xu P. The pathway and biochemical mechanism of *Fusarium proliferatum* infecting corn sheath[D]. Baoding: Master's Thesis of Agricultural University of Hebei, 2013 (in Chinese)
- 徐鹏. 层出镰孢侵染玉米叶鞘的途径及生化机制[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2013

(上接 p.2104)

征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
- 王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
- 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
- 刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。(4) 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登录我刊系统上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>