

真菌遗传转化系统的研究进展*

黄亚丽^{1,2} 叶婧¹ 蒋细良³ 朱昌雄^{1**}

(中国农业科学院环发所 北京 100081) (河北省生物研究所 石家庄 050081) (中国农业科学院植保所 北京 100081)

摘要 真菌遗传转化是功能基因研究的重要方法,就真菌遗传转化系统的最新研究进展进行了综述,主要包括真菌遗传转化的方法、各种方法的优缺点、选择标记的种类、标记基因的分选方法以及转化系统的应用等。

关键词 真菌,转化系统,选择性标记,功能基因组

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1213-05

Advance in Genetic Transformation System of Fungi*

HUANG Ya-Li^{1,2} YE Jing¹ JIANG Xi-Liang³ ZHU Chang-Xiong^{1**}

(Institute of Agricultural Environment and Sustainable Development, CAAS, Beijing 100081)

(Biological Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050081) (Institute of Plant Protect, CAAS, Beijing 100081)

Abstract The fungal genetic transformation is an essential method for the research of functional genes. The latest advance in fungal genetic transformation system was reviewed in this paper, mainly including transformation methods and their advantages and disadvantages, types of selective markers, separation methods of the tagged gene and the application of the transformation system.

Key words Fungi, Transformation system, Selective markers, Functional genome

众所周知,真菌在工业、农业、医药以及基础生物学研究中发挥着重要作用。一些真菌是重要的工业菌株,用于生产酶、有机酸等物质;另外,真菌也与农业密切相关,部分真菌是动植物病原菌,如稻瘟病菌、立枯病菌,还有的真菌具有防治动植物病虫害的功能,如绿僵菌、木霉菌;医药行业同样也离不开真菌,如青霉素和头孢霉素等抗生素都是由真菌产生的;此外,酿酒酵母、构巢曲霉和粗糙脉孢霉等是生物学基础研究的模式菌株。因此,对真菌进行系统的研究具有重要意义。

随着越来越多的真菌基因组测序完成,真菌生物学进入了功能基因组时代,对能够进行大规模功能基因组研究工具的需求明显增加。构建突变体是研究功能基因的重要方法,这一方法应用的关键在于遗传转化系统的建立和发展。遗传转化技术为人类进一步分离基因和分析基因功能提供了强有力的工具,目前已经广泛用于细菌、真菌以及高等动植物。本文对真菌遗传转化系统的进展以及应用进行

了综述。

1 真菌遗传转化的方法

自1973年Mishra和Tatum^[1]首次报道粗糙脉孢霉的DNA转化以来,真菌遗传转化研究得到了迅速的发展,建立了PEG-CaCl₂介导的遗传转化、电激介导的遗传转化、转座子介导的遗传转化、限制性内切酶介导的遗传转化、农杆菌介导的遗传转化等多种方法。

1.1 PEG-CaCl₂介导的真菌遗传转化

PEG-CaCl₂介导的真菌遗传转化以原生质体为感受态细胞,将受体细胞悬浮于含质粒DNA的溶液中,转化在一定浓度的PEG、CaCl₂和pH8~9条件下进行^[2]。PEG是一种能够促进原生质体吸收外源DNA的化学诱导剂,在高pH情况下,PEG通过电荷间相互作用与外源DNA形成紧密的复合物,受体细胞通过内吞作用吸收这些复合物到细胞内,随后进入细胞核并整合到受体基因组中。

* 国家自然科学基金资助项目(No.30671400)

** 通讯作者 Tel 010-68919561, E-mail zhucx120@163.com

收稿日期:2007-05-11,修回日期:2007-05-29

原生质体的制备与再生是 PEG-CaCl₂ 转化方法的基础,真菌的原生质体制备通常采用酶法消化细胞壁获得,目前常用的细胞壁裂解酶有 cellulase、snailase、lysinase 等。一般采用幼嫩菌丝、分生孢子和担孢子来获得原生质体^[3]。影响原生质体制备和再生的因素很多,包括液体培养基的成分、菌丝体的培养温度、菌丝体的生长期、制备原生质体的溶菌温度和溶菌时间等。周礼红研究表明在培养基中加入一定量的甘氨酸可增加原生质体制备效率,这是由于甘氨酸代替 D-丙氨酸合成细胞壁降低了细胞壁之间的交连^[2]。

该转化系统的转化效率与转化参数存在密切关系,PEG 的分子量和浓度、CaCl₂ 的浓度和 pH 都影响转化效率。PEG 转化系统的转化效率还与转化的物种相关,对大型真菌的转化效率较低,李刚等利用 PEG 转化系统进行了灵芝的转化研究,转化效率为 5~6 个转化子/ $\mu\text{gDNA}^{[4]}$ 。

1.2 电激转化系统

电激转化法是利用脉冲电场对受体细胞进行可恢复性电激穿,在原生质体膜上形成可逆的瞬间通道,外源 DNA 大分子能穿过质膜进入受体细胞并与受体 DNA 发生重组。电激法转化原生质体的效果与电激时所用的脉冲电场强度、脉冲持续时间、脉冲个数、电激缓冲液组成、目的 DNA 和载体 DNA 的浓度和比例、电激前后的冷激处理及原生质体培养系统等多种因素相关。电激转化法具有简单、快速的特点,其转化效率与 PEG 化学融合法相当。该法适用范围很广,因此可成为 PEG 融合法的一个补充。

为了增加转化效率,将目的 DNA 包被在重金属钨或金的表面,在脉冲电场作用下,包被 DNA 的金属颗粒可穿入器官、组织或培养的细胞中,从而实现外源基因的高效转移。Bills 等利用该法将潮霉素 B 磷酸转移酶基因和 G-D 葡萄糖醛酸酶基因成功转入卷边网褶菌^[5]。

1.3 转座子介导的真菌遗传转化

转座子是存在于染色体或质粒上的可自主复制和移位的基本单位,转座子具有插入到细胞基因组不同位点的能力,可导致基因发生重排并引起突变。当转座子跳跃插入到某个功能基因时,就可引起该基因的失活,并诱导产生相应的突变型。转座子标签法是利用转座子的这一特点发展起来的一种非常

有效的真菌遗传转化方法。

真菌中的转座子首先是在酿酒酵母中发现的,随后发现丝状真菌中也存在转座子,现在已发现的转座子有 *Fusarium oxysporum* 中的 *Fot1* 和 *impala*^[6]、*Tolytlocladium inflatum* 中类似 *Ac* 的转座子、*N. crassa* 中的 *Tad1-1*、*M. grisea* 中的 *MAGGY*、*MGR586*、*Pot2* 和 *Pot3* 等(李宏宇,福建农林大学博士学位论文,2004)。Guanggan Hu 等利用修饰的 *GPS3* 转座子实现了对 *Cryptococcus neoformans* 和 *Cryptococcus gattii* 菌株的转化并分离出了多个功能基因^[7]。

虽然利用转座子这样的可移动片段成功实现了一部分真菌的遗传转化,但并不是所有真菌中都存在转座子,而且已发现的转座子在稳定性和随机插入方面也不能够完全满足基因分析的要求。许多转座子在真菌中的应用表明转座位点不完全随机,而是更倾向于非编码区,另外转座后易发生染色体重排^[8]。

1.4 限制性内切酶介导的真菌遗传转化 (Restriction Enzyme-Mediated Integration-REMI)

REMI 是一种将线性化的质粒 DNA 随机插入到生物体基因组 DNA 中从而产生插入突变的技术。REMI 共包括 3 步,即限制性酶介导的转化过程、转化子的筛选过程和突变基因的分离过程。具体转化过程是将线性化的质粒和限制性内切酶(该酶能酶切真菌基因组 DNA 产生与线性质粒末端互补的粘性末端)以及原生质体混合后,加入一定浓度 PEG/CaCl₂,作用一段时间后,取一定体积的反应物涂布在抗性培养基平板,培养直至转化子出现。虽然不同真菌的 REMI 的转化过程基本相同,但是对于不同的转化受体来说,要获得较高的转化效率需要对转化过程中的各环节如限制酶的种类、浓度、PEG 的浓度、分子量、转化时间、温度和抗生素的浓度等进行摸索。

该技术是 Schiestl 和 Petes 在研究酿酒酵母时建立起来的,目前已经利用 REMI 成功转化了梨黑斑病菌、烟曲霉、黑曲霉、玉米小斑病菌、菜豆炭疽菌、藤仓赤霉、稻瘟病菌、玉蜀黍球腔菌和青霉等十多种真菌(李宏宇,福建农林大学博士学位论文,2004)。

相对于前几种转化系统,REMI 提高了转化效率,增加了单拷贝插入的机率,能够通过质粒拯救与 PCR 等技术快速分离被标签的目的基因。但 REMI

也存在一些缺点,如大约 30%~50% 转化子不是由 DNA 转化引起的,这给进一步分离基因带来困难,造成基因的误译^[9]。另外,外源 DNA 的整合不完全随机,而是倾向于高频转录的基因位点,从而很难建立覆盖整个基因组的突变体库。REMI 还存在多位点、串联插入及质粒的重排,这也阻碍质粒拯救的克隆途径^[10]。

1.5 农杆菌介导的真菌遗传转化系统(Agrobacterium Mediated Transformation-AMT)

农杆菌是革兰氏阴性菌,自然情况下它可通过伤口进入植物细胞,并将其 T-DNA 序列转入植物细胞并整合到基因组上,据此建立了农杆菌介导的植物遗传转化系统。现在该技术已广泛用于真菌的遗传转化,该技术应用于真菌转化的十年间,研究者从农杆菌菌株的类型、质粒的构建、转化真菌的菌体形态到筛选转化子的抗生素浓度、头孢霉素浓度、乙酰丁香酮的用量及使用时间、根癌农杆菌的浓度、转化时间及转化温度进行了全面的研究,使根癌农杆菌转化真菌的转化体系趋于成熟,这为优化转化体系使其能够转化更多、更难转化的真菌提供了基础。

1995年 Paul Bundock 等人首次发现根癌农杆菌能够转化除植物以外的物种——*Saccharomyces cerevisiae*^[11]。3年后 de Groot 证实根癌农杆菌能够转化 *Aspergillus niger*, *Trichoderma Reesei*, *Neurospora crassa*, *Agaricus bisporus*, *Colletotrochum gloeosporioides* 和 *Fusarium venenatum* 六种真菌^[12],目前利用该方法转化的真菌已经超过 30 种^[13],这为真菌功能基因组的研究奠定了基础。

与其它转化方法相比,AMT 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^[12]。2) 农杆菌转化系统转化效率高,研究表明农杆菌介导丝状真菌的转化效率一般在 300~7200 个转化子每 10⁷ 个细胞,比其他真菌转化方法高 100~1000 倍^[12]。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) 该方法的转化子稳定,AMT 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。Raed O. Abuodeh 等对农杆菌转化所得的 60 个 *Coccidioides immitis* 转化子的遗传稳定性进行了研究,经过在无潮霉素抗性的 GYE 培养基

上连续传代 2 周后,转化子仍具有相同的潮霉素抗性^[14]。

2 选择性标记

合适的选择标记是进行遗传转化的前提,有效的选择标记可降低假阳性、减少工作量。真菌转化系统所用的质粒通常带有选择性标记,该标记通常位于一个强的组成型启动子下游,该基因的表达使基因组上整合有外源质粒的细胞易于分离,真菌转化的选择性标记主要包括营养缺陷型标记和抗药性标记。

2.1 营养缺陷型标记

营养缺陷型标记是一种常用的选择性标记,通过转入的标记基因与受体细胞突变基因互补,使受体细胞表现野生型生长。研究者构建了带有不同营养缺陷标记基因的质粒,尿嘧啶合成基因是一种最常用的营养缺陷型标记,带有尿嘧啶合成基因的质粒整合到尿嘧啶营养缺陷型菌株的基因组 DNA 后,转化子恢复了合成尿嘧啶的能力,从而可以在含 5-氟乳清酸的平板上生长。常用于真菌转化的营养缺陷型标记基因还有编码色氨酸生物合成酶的 *Trp-1* 基因、编码 NADP 特异的谷氨酸脱氢酶的 *am* 基因等。据 Cutler SB 等人报道 *Stagonospora nodorum* 的硝酸盐还原酶基因 *nial* 已经被克隆,并被用于构建一种依赖于硝酸盐同化作用的转化系统^[15]。Sandhu 等人在进行金龟子绿僵菌和球孢白僵菌转化时采用 *niaD* 基因作为选择性标记^[16]。Kostyantyn V 等利用 *Leu2* 基因作为标记对假丝酵母 *Leu2⁻* 进行转化,在含铁的培养基中不过量产生核黄素的为转化子^[17]。

潘炜华等人发现了一种表型缺陷型标记,研究者筛选出了一个酵母荚膜缺陷株,并构建了一个含有 *cap70* 和 *ura5* 标记基因的质粒,该质粒可以恢复酵母产荚膜的特性,从而筛选出转化子^[18]。

2.2 抗药性标记

抗药性标记在真菌遗传转化系统中应用很普遍,该类基因的转入可以使受体细胞表现出药物抗性。潮霉素 B 抗性基因 *hph* 是在真菌遗传转化体系中应用最广泛的抗药性标记,研究者将该基因整合到多种质粒上成功的转化了很多真菌,一般情况下真菌对潮霉素比较敏感,100 μ g/mL~200 μ g/mL 的潮霉素 B 就能筛选出转化子。Richard J 利用含有潮霉素抗性标记的 *Y16* 质粒对 *S. sclerotiorum* 进行了

转化,用含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的潮霉素 B 的选择性培养基筛选转化子^[19],Hanif 等(2002)在对 *S. bovis* 进行农杆菌转化时,以潮霉素磷酸转移酶基因作为选择标记基因,全部抗性转化子的 PCR 均为阳性^[20]。

但有些真菌对潮霉素 B 不敏感,在这类真菌的遗传转化中常选用抗除草剂和抗真菌剂的选择性标记,典型的代表有 benomyl 抗性基因 *p-tubulin* 和有 phosphinothricin 抗性的 *bar* 基因。徐文静等进行了球孢白僵菌最适遗传转化筛选标记的研究,通过该菌对潮霉素 B、卡那霉素、除草剂等 10 多种药剂的敏感性测验表明,150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的除草剂能够完全抑制野生球孢白僵菌的生长^[21],这为进一步开展球孢白僵菌遗传转化工作奠定了基础。

另外,能够作为抗性标记的还有抗稻瘟菌素 S 的基因、编码寡霉素抗性的 *oliC* 基因、博莱霉素抗性基因、腐草霉素抗性基因以及氨基糖苷类、大环内酯类和金属糖肽类抗生素抗性基因等。

3 标签基因的分离方法

转化子标签基因的分离是进行真菌转化的最终目标,在分离标签基因之前必须先确定外源 DNA 的整合情况。Southern 杂交是验证外源 DNA 是否整合和确定整合拷贝数最常用的方法,将要验证的转化子基因组 DNA 进行酶切,酶切产物用琼脂糖凝胶分离之后转移到尼龙膜上,利用合适的序列为探针进行杂交。由于使用的限制性酶在外源质粒中无酶切位点,所以每插入一个质粒便会产生一个比质粒大一些的条带。该片段将被用于外源 DNA 整合位点侧翼序列的分离,常用的标签基因分离方法有质粒拯救方法和基于 PCR 的方法。

3.1 质粒拯救方法

质粒拯救常被用于分离整合位点的侧翼序列,该过程中采用酶的酶切位点在外源质粒两侧的基因组 DNA 上。质粒拯救的步骤是首先用合适的酶对基因组 DNA 进行酶切,然后分离两端带有基因组序列的质粒,将该段 DNA 进行自连产生环状 DNA 转化到 *E. coli* 的细胞中,最后将质粒 DNA 从细菌转化子中提取出来,采用质粒拯救中的酶酶切该质粒,并对其测序。质粒拯救已成功用于多种真菌的 REMI 插入侧翼序列、T-DNA 插入侧翼序列以及其他真菌转化系统插入侧翼序列的分离,王刚利用质粒拯救从 REMI 突变体中分离到了一个与稻瘟病菌产孢和

生长相关的基因^[22],Kostyantyn V 等利用质粒拯救技术从 REMI 突变体中获得了多个与假丝酵母核黄素产生相关的基因^[17]。

3.2 基于 PCR 的方法

基于 PCR 的方法也常被用于侧翼序列的分离,例如,反向 PCR、载体 PCR、热不对称 PCR (Terminal Asymmetric Interlaced PCR-TAIL-PCR)。TAIL-PCR 方法是应用最广、效率最高的一种方法,它采用一系列巢式特异引物和一条随机引物,PCR 过程中采用不同的退火温度以使各种引物能够发挥其最大功用。第一轮 PCR 以转化子基因组 DNA 为模板,采用巢式引物中最外侧的一条引物和随机引物进行扩增,扩增出多条 PCR 产物,然后以第一轮 PCR 产物为模板,以巢式引物中第二条和随机引物为一对引物进行第二轮 PCR,随后依次以前一轮的 PCR 产物为模板,以内侧巢式引物和随机引物为一对引物,进行下一轮的 PCR,直到特异片段达到可测水平,对该片段回收测序。一般情况下三轮 PCR 就可得到所需的条带。该技术曾成功的用于植物突变体库整合位点的高通量鉴定^[23]。目前,该方法也广泛用于真菌转化子 T-DNA 标签的侧翼序列的分离和克隆,成功率达 90%~100%。Tsuji 等利用 AMT 方法对 *C. lagenarium* 进行转化,在获得的 5000 个转化子中筛选出了 8 个黑色素合成缺陷的菌株,利用 TAIL-PCR 的方法扩增出 T-DNA 的侧翼片段,序列分析发现其中的一个片段为 *C. lagenarium* 的黑色合成酶基因 *Pks1*^[24]。

4 真菌遗传转化系统的应用与展望

真菌遗传转化是进行同源重组的有效工具,为证实特定基因的功能提供了有力的证据。在真菌转化系统中,如果构建的质粒含有与宿主基因组同源的序列,外源质粒就会以同源重组的方式整合到宿主基因组上。对于 AMT 方法而言,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的敲除,可根据表型确定该基因的功能。目前利用 AMT 成功实现了 *A. awamori*、*M. graminicola*、*Glarea lozoyensis* 等多种真菌的同源重组。黄玉杰研究表明,AMT 是进行绿色木霉同源重组的有效方式^[25]。REMI 也可以进行同源重组,De Lozanne 研究表明利用 REMI 可在盘基网柄菌中

实现高频同源重组^[26]。其它真菌转化系统也可以进行同源重组,Zeilinger等利用PEG/CaCl₂介导的方法对*T. atroviride*进行转化,但同源重组的频率较低^[27]。

真菌遗传转化是研究功能基因的重要手段。利用携带异源序列的质粒转化真菌会发生插入失活产生随机突变体,目前利用真菌遗传转化系统已经获得了多种真菌的随机突变体并建立了插入突变体库。张文荟等利用REMI技术建立了一个包含有1000多个插入突变体的稻瘟病菌突变体库,从中鉴定了多个与致病性相关基因^[28],为该菌致病功能基因的分离奠定了基础。Sweigard等则从已建立的REMI插入突变体库中,分离得到了致病基因PTH1,PTH2,PTH3和PTH4^[29]。Gento Tsuji等人利用AMT转化了刺盘孢菌,并利用TAIL-PCR方法从黑色素产生突变体中分离到了黑色素生物合成基因PksI^[24]。

真菌遗传转化具有改造菌株的功能,利用携带有某一特定基因的外源质粒转化受体菌株,从而赋予该菌特殊的功能。有用基因的转化是提高生防菌株功能的有效途径,高兴喜等人利用AMT技术将Bt杀虫基因CryA(*b*)I导入生防真菌哈茨木霉菌中,所得到的转化子既保持了出发菌株原有的抑菌活性,又表现了对玉米螟的毒杀作用,兼有杀虫防病双重作用的基因工程木霉菌株的构建显示了更好的生防前景^[30]。黄玉杰等人利用AMT技术将Chi113基因整合到绿色木霉基因组上,使该菌的生防功能增强^[26]。陈振明等利用REMI技术将绿色木霉的几丁质酶转化到毛壳霉中,这为提高生防菌的抑菌活性打下了基础^[31]。

总之,真菌遗传转化系统的建立为人们从基因水平研究真菌的遗传背景提供了条件,随着对真菌遗传转化各个因素的深入研究,遗传转化系统将会成为研究真菌功能基因、分离标记基因的更加有效的手段。

参考文献

- [1] Mishra N C ,Tatum E L. Tech Tips Online ,1973 ,**70** :3875 ~ 3879.
- [2] 周礼红 ,李国琴 ,王正祥 ,等. 遗传 ,2005 ,**27**(3) :423 ~ 428.
- [3] 李 娟 ,杨金奎 ,梁连铭 ,等. 江西农业大学学报 ,2006 ,**28**(4) :516 ~ 521.
- [4] 李 刚 ,王 强 ,刘秋云 ,等. 菌物学报 ,2004 ,**23**(2) :255 ~ 261.
- [5] Bills SN ,Ricehter DL ,Podila GK. Mycol Res ,1995 ,**99** :557 ~ 561.
- [6] Migheli Q ,Lauge R ,Daviere J M , et al. Genetics ,1999 ,**151** :1005 ~ 1013.
- [7] Guanggan Hu ,James W. Kronstad. Curr Genet ,2006 ,**49** :341 ~ 350.
- [8] Hua Van A ,Pamphile J A ,Langin T et al. Mol Gen Genet 2001 ,**264** :724 ~ 731.
- [9] Epstein L ,Lusnak K ,Kaur S. Fungal Genet Biol ,1998 ,**23** :189 ~ 203.
- [10] Vithalani KK ,Shoffner JD ,De Lozanne A. J Cell Biochem ,1996 ,**62** :290 ~ 301.
- [11] Bundock P ,van Attikum H ,den Dulk Ras A ,et al. Yeast ,2002 ,**19** :529 ~ 536.
- [12] de Groot M J ,Bundock P ,Hoykaas P ,et al. Nat Biotechnol ,1998 ,**16** :839 ~ 842.
- [13] Beno't Lacroix1 ,Tzvi Tzfira2 ,Alexander Vainstein , et al. Trends in Genetics 2006 ,**22**(1) :29 ~ 38.
- [14] Raed O. Abuodeh ,Marc J. Orbach ,M. Alejandra Mandel. JID 2000 ,**181**(6) :2106 ~ 2111.
- [15] Cutler S B ,Cooley R N ,Caten C E. Curr Genet ,1998 ,**34** :128 ~ 137.
- [16] Sandhu S S ,Kinghorn J R ,Rajak R C , et al. Indian J Exp Biol ,2001 ,**39**(7) :650 ~ 653.
- [17] Kostyantyn V. Dmytruk ,Andriy Y. Voronovsky ,Andriy A , et al. Curr Genet 2006 ,**50** :183 ~ 191.
- [18] 潘炜华 ,廖万清 ,霍克克 ,等. 中华医学杂志 2001 ,**81**(12) :748 ~ 752.
- [19] Richard J. Weld , Colin C. Eady , Hayley J. . Journal of Microbiological Methods 2006 ,**65** :202 ~ 207.
- [20] Hanif M ,Pardo G A ,Gorfer M , et al. Current Genetics ,2002 ,**41** :183 ~ 188.
- [21] 徐文静 ,马德良一 ,刘 娜 ,等. 吉林农业科学 ,2006 ,**31**(1) :50 ~ 52.
- [22] 王 刚 ,杨之为 ,彭友良. 河南大学学报 2002 ,**32**(3) :11 ~ 16.
- [23] Liu Y ,q Mitsulecawa N ,Oosumi T , et al. The Plant Journal ,1995 ,**8** (3) :457 ~ 463.
- [24] Gento Tsuji ,Satoshi Fujii ,Naoki Fujihara , et al. Gen Plant Pathol ,2003 ,**69** :230 ~ 239.
- [25] Huang Yujie ,Yang Hetong ,Chen Kai , et al. SHANDONG SCIENCE ,2005 ,**18**(3) :30 ~ 36.
- [26] De Lozanne A. Methods in Cell Biology. 1987 ,**28**(2) :489 ~ 495.
- [27] Zeilinger S. Curr. Genet ,2004 ,**45** :54 ~ 60.
- [28] 张文荟 ,周益军 ,范永坚 ,等. 南京师大学报 ,2002 ,**25**(2) :17 ~ 22.
- [29] Sweigard J A ,Carroll A M ,Farrall L , et al. Mol Plant-Microbe Interact ,1998 ,**11** :404 ~ 412.
- [30] 高兴喜 ,杨 谦. 科学通报 ,2004 ,**49**(21) :11 ~ 16.
- [31] 陈振明 ,王政逸 ,郭泽建. 菌物系统 ,2002 ,**21**(3) :375 ~ 382.