

橡胶树胶孢炭疽菌 T-DNA 插入突变体库构建及其致病缺陷转化子筛选

蔡志英^{1,2,3} 林春花² 时涛² 霍姗姗¹ 蔡吉苗² 刘先宝² 黄贵修^{2*}

(1. 海南大学 环境和植物保护学院 海南 儋州 571737)

(2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所 中国热带农业科学院 海南 儋州 571737)

(3. 云南省热带作物科学研究所 云南 景洪 666100)

摘要:【目的】进一步研究橡胶树胶孢炭疽菌致病分子机理。【方法】通过含 ILV1 基因(具氯嘧磺隆抗性)的 pSULF·gfp 二元载体农杆菌 AGL-1 介导进行橡胶树胶孢炭疽菌遗传转化, 利用氯嘧磺隆抗性标记筛选转化子, 对转化子 PCR 验证及荧光显微观察; 采用离体古铜期橡胶树叶无伤接种法进行致病性缺陷转化子筛选, 并对转化子进行遗传稳定性检测。【结果】获得含 3 721 个转化子的 T-DNA 插入突变体库, 转化效率为 150-400 个转化子/ 10^6 孢子, 从 3 721 个转化子中筛选得到致病性缺陷转化子 25 个; 随机选取 20 个转化子进行遗传稳定性测定, 在不含氯嘧磺隆 PDA 平板上继代培养 10 次后仍保持氯嘧磺隆抗性, 且表型稳定, 表明插入外源基因能够稳定遗传。【结论】可以利用根癌农杆菌介导橡胶孢炭疽菌转化, 构建橡胶树胶孢炭疽菌 T-DNA 插入突变体库, 筛选致病缺陷突变菌, 为进一步研究该菌致病相关基因提供材料。

关键词: 遗传转化, 插入突变, 致病基因, 炭疽病, 胶孢炭疽菌

Generation of a transformant library of *Colletotrichum gloeosporioides* by ATMT and screen of the mutants defective in pathogenicity

CAI Zhi-Ying^{1,2,3} LIN Chun-Hua² SHI Tao² HUO Shan-Shan¹

基金项目: 国家天然橡胶产业技术体系资金资助项目(No. CARS-34-GW8); 海南大学“211 工程”建设项目课题; 海南大学环境与植物保护学院研究生创新平台资助

*通讯作者: Tel: 86-898-23307796; 信箱: hgxiu@vip.163.com

收稿日期: 2011-10-12; 接受日期: 2011-11-23

CAI Ji-Miao² LIU Xian-Bao² HUANG Gui-Xiu^{2*}

(1. Environment and Plant Protection College, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China)

(2. Environment and Plant Protection Institute, CATAS, Danzhou, Hainan 571737, China)

(3. Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong, Yunnan 666100, China)

Abstract: [Objective] Generation of *C. gloeosporioides* T-DNA insertion mutant library through *Agrobacterium*-mediated transformation was conducted in order to get more insight into the molecular mechanisms underlying the pathogenicity of *C. gloeosporioides*. [Methods] *Agrobacterium* containing the binary vector pSULF-gfp was used for transformation of *C. gloeosporioides*. Chlorimuron-ethyl resistant transformants were screened out and subjected to biological, morphological observation and PCR test. Detached copper-colour rubber leaves were used for pathogenicity assay. [Results] The transformation efficiency was up to 150–400 transformants per 10⁶ conidia and 3721 transformants were generated, 25 transformants defective in pathogenicity were screened out from 3721 transformants. All of the transformants tested remained mitotically stable, maintaining their Chlorimuron-ethyl resistance after tenth generations of growth in the absence of Chlorimuron-ethyl. [Conclusion] ATMT can be used to rapidly generate a large library of the fungal transformants, which offers highly efficient means for characterizing the genes that are important for the pathogenicity of *C. gloeosporioides* and should facilitate further molecular studies of this important plant pathogen.

Keywords: Fungal transformation, Insertional mutagenesis, Pathogenic gene, Anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*

橡胶树(*Hevea brasiliensis*)又名巴西橡胶树、三叶橡胶树, 俗称胶树。其分泌的胶乳, 是重要的工业原料及战略物质, 在国民生产中具有不可替代的作用, 目前国内产胶量远远不能满足市场需求。橡胶炭疽病是橡胶树重要病害, 能侵染叶片、嫩梢及橡胶果。该病大流行导致橡胶树大量落叶, 延迟开割, 造成严重的产量损失。早期研究表明, 在我国该病致病菌为胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)^[1], 2008年发现尖孢炭疽菌(*Colletotrichum acutatum*)也能致病^[2]。数十年来, 国内外学者及植保科技人员在病原菌种类、遗传多态性、生物学特性、不同橡胶品种对该病的抗性及其防治等方面做了大量研究, 取得许多重要研究进展^[3], 但是由于大面积种植单一品种及病原菌种群多样性的影响, 该病是威胁

我国天然橡胶产业持续、健康发展的重要生物因素之一。

通过目标和随机插入使基因突变是研究植物病原真菌入侵分子机理的一种有效方法^[4]。自1995年 Bundock 首次用根癌农杆菌转化啤酒酵母以来^[5], 通过 ATMT 转化丝状真菌成为热门课题, 子囊菌、半知菌、担子菌及接合菌也有成功转化报导^[6]。与先前的原生质体遗传转化体系相比, ATMT 不需要制备原生质体, 大大简化转化操作, 具有转化效率高, 单拷贝随机插入突变体多等优点^[7]; 与化学或辐射诱变相比, 插入突变的优势还在于标记基因, 容易通过标记鉴定到目标基因^[8]。目前, 橡胶树炭疽菌分子致病机理研究尚处于起步阶段。2009 魏小慧等用启动子捕获技术构建了一个含 1 105 个转化子的橡胶树胶孢

炭疽菌突变体库^[9]; 同年, 本实验室获得橡胶树尖孢炭疽菌绿色荧光蛋白(GFP)标记突变体库, 含 2 000 多个转化子, 正在进行致病性相关基因的克隆与功能分析^[10]。与此同时, 本实验室着手建立橡胶树胶孢炭疽菌 ATMT 突变体库, 筛选获得致病力缺陷转化子, 无疑有助于橡胶树炭疽菌致病分子机理的深入研究, 为更有效制定综合防治策略和开发新型防治药剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒: 从海南省儋州市橡胶树炭疽病叶上分离获得致病力强的胶孢炭疽菌, 经单孢分离后保存备用。

质粒 pSULF-gfp, 以 pCAMBIA1300 为骨架, 含有 *ILVI* 基因(有氯嘧磺隆抗性), 由英国诺维奇 Johnes 中心 Sainsbury 实验室 Anne E. Oshourn 惠赠^[11]。农杆菌菌株 AGL-1, 由中国科学院微生物研究所何朝族研究员惠赠。

1.1.2 培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA), 用于胶孢炭疽菌培养; LB 培养基用于细菌培养。

MM 培养基用于培养 AGL-1 农杆菌(g/L): K_2HPO_4 2.05, KH_2PO_4 1.45, NaCl 0.15, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.10, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.50×10^{-3} , $(NH_4)_2SO_4$ 0.50, 葡萄糖 2.0 (灭菌后加入), 1×10^5 Pa 条件下灭菌 20 min。

IM 液体培养基用于诱导 AGL-1 农杆菌 Vir 基因活化(g/L): ddH₂O 1 000 mL, MES 8.54, 甘油 5, AS 200 μ mol/L (灭菌后加入), K_2HPO_4 2.05, KH_2PO_4 1.45, NaCl 0.15, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.10, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.50×10^{-3} , $(NH_4)_2SO_4$ 0.50, 葡萄糖 2.0 (灭菌后加入), 1×10^5 Pa 条件下灭菌 20 min。

DCM 培养基(g/L)用于筛选转化子: Yeast extract without AA 1.7, 天冬氨酸 2.0, NH_4NO_3 1.0, 葡萄糖 10.0, 用 Na_2HPO_4 将 pH 调节至 6.0,

1×10^5 Pa 条件下灭菌 20 min, 冷却到 55 °C 左右加氯嘧磺隆(终浓度为 50 mg/L)、四环素(终浓度为 50 mg/L)、头孢(终浓度为 100 mg/L)。

1.1.3 试剂: 乙酰丁香酮、Acetosyringone, Bio Basic INC; 95% 氯嘧磺隆、Chlorimuron-ethyl, 上海博亚生物技术有限公司; 卡那霉素、Kanamycin sulfate, BBI; 利福平、Rifampicin, Bio basic INC; 头孢噻肟钠、Cefotaxime sodium, Solarbio Germany; 四环素、Tetracycline, 生工生物工程上海有限公司; 不含氨基酸的酵母粉、Yeast nitrogen base W/O amino acids, Solarbio; L-天门冬酰胺、L-asparagine, Bio Basic INC; 咪鲜胺、Prochloraz, Sigma-aldrich。其它试剂均为国产分析纯。引物由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 受体培养方法: (1) 孢子悬浮液的制备。将胶孢炭疽菌接种到 PDA 固体培养基上, 28 °C、自然光照, 培养直至产孢, 吸取孢子, 用 IM 配制孢子悬浮液浓度为 1×10^6 个孢子/mL, 4 °C 保存, 备用(受体 A)。将胶孢炭疽菌接种到 PDB 液体培养基, 28 °C、黑暗、180 r/min 培养 4 d, 然后用移液枪吸取孢子悬浮液, 过滤, 离心, 弃上清液, 用 IM 漂洗 2 次, 调节孢子浓度 1×10^6 个孢子/mL, 4 °C 保存, 备用(受体 B)。(2) 菌丝体的制备。将 200 μ L 胶孢孢子(1×10^6 个孢子/mL)悬浮液涂布于 PDA 平板上, 28 °C, 黑暗条件下分别培养 24 h (受体 C)和 48 h (受体 D), 取出平板, 加 5 mL IM 液体培养基用灭菌棉签将菌丝打成小段, 4 °C 保存, 备用。

1.2.2 农杆菌介导胶孢炭疽菌遗传转化: 根据林春花等方法^[10], 略有改动。将含有重组质粒的 AGL-1 农杆菌在 LB 平板(含利福平 10 mg/L, 卡那霉素 50 mg/L)上划线, 28 °C 培养 2 d, 挑取单菌落, 接种到 10 mL MM 液体培养基(卡那霉素 50 mg/L, 利福平 10 mg/L)中, 180 r/min, 振荡

培养 48 h。室温下, 5 000 r/min 离心 6 min, 使 AGL-1 农杆菌体沉淀, 弃去上清液, 加入 IM (含 200 $\mu\text{mol/L}$ AS) 液体培养基, 180 r/min、28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡诱导培养 6 h, 用 IM 培养基将 OD_{600} 调为 0.5–0.8, 备用。

将经过 AS 诱导的 AGL-1 农杆菌分别与受体 A、B、C 和 D 等体积混合后, 取 200 μL 混合液涂布于铺有硝酸纤维素膜的 IM 固体培养基上(含 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 AS)。25 $^{\circ}\text{C}$ 共培养 2 d 后, 用灭菌手术刀将微孔滤膜切成约 4 mm 宽的纸条, 反贴于含 50 mg/L 氯喹磺隆的 DCM (四环素 50 mg/L, 头孢霉素 100 mg/L) 筛选培养基上, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养 6 d 后, 分批挑转化子到含 100 mg/L 氯喹磺隆的 DCM (四环素 50 mg/L, 头孢霉素 100 mg/L) 筛选培养基上再次复筛。

转化率统计, A、B、C 和 D 四种受体与 AGL-1 农杆菌共培养的 10 个平皿为一处理, 重复 3 次。

1.2.3 致病性缺陷型转化子筛选: 参照 Bang-Jau You 等方法进行^[12], 用离体、古铜期热研 7-33-97 古铜期或变色期橡胶叶(叶长约为 3 cm–4 cm) 进行筛选。取胶孢转化子带菌琼脂块(直径 6 mm) 接种到无伤口离体橡胶叶上, 菌丝体与叶片表面直接接触, 以野生型为对照, 进行初筛致病力缺陷的转化子, 初筛得到致病力缺陷转化子, 再用孢子悬浮液接种评价方法进行复筛^[13], 将孢子用灭菌水从菌落上冲洗下来, 调节浓度到 1×10^6 个孢子/mL, 用移液枪移取 20 μL 滴到橡胶叶片上, 每叶接种 6 点, 每缺陷转化子接种 5 叶片, 以野生菌为对照, 重复 3 次。叶片接种后放置于保湿盘内, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 接种第 3 天开始逐日观察。

1.2.4 转化子验证: (1) 转化子基因组 DNA 提取及其 GFP 基因的 PCR 检测。随机选取 23 个胶孢炭疽菌转化子, 接种到 CM 液体培养基中 28 $^{\circ}\text{C}$

振荡培养 4 d, 真空抽滤收集菌丝体, 灭菌水冲洗 3 次, 用 CTAB 法提取基因组 DNA。PCR 技术检测 GFP 基因是否插入。GFP 基因引物对为 GFP-F (5'-TACTGCAGATGGTGAGCAAGGGC GAG-3') 和 GFP-R (5'-CGGGATCCCTTGTACAG CTCGTCCATG-3')。检测重组质粒 pSULF.gfp 的 GFP 基因。PCR 反应体系: 10 \times Buffer 2.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ GFP-R 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ GFP-F 1 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , 模板 DNA 0.5 ng, 0.5U Taq 酶 0.2 μL , 总体积 25 μL 。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测分析, 观察记录结果。

(2) 转化子绿色荧光显微观察。随机选取阳性转化子, 从菌落上挑取转化子菌丝及孢子制片, 用奥林巴斯荧光共聚焦显微镜 FV1000 (OLYMPUS FLOUOVIEW FV1000) 在蓝光(488 nm) 下进行观察, 照片以 JPEG 文件输出。

1.2.5 转化子遗传稳定性检测: 随机选取 20 个阳性转化子接种 PDA 培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 自然光照培养 6 d 后, 转接到 PDA 培养基上继代培养 10 次后, 再接种到在含 100 mg/L 氯喹磺隆的 DCM 培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 自然光照培养 6 d 后, 观察菌落生长情况及绿色荧光。

2 结果

2.1 不同转化受体的转化效率比较

由于该菌在 PDA 平板上不易产孢, 且产孢量少, 因此进行最佳受体筛选实验, 结果发现橡胶树炭疽菌孢子和菌丝片段均可作为转化的材料。受体 A, 每 10 个共培养平皿(约为 1×10^6 孢子/mL) 转化率为 344 个转化子, 受体 B, 转化率为 323 个转化子; 受体 C, 转化率为 256 个转化子; 受体 D, 转化率为 218 个转化子(图 1)。

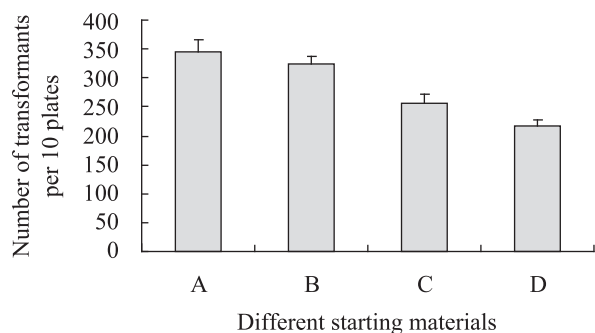


图1 不同受体转化率

Fig. 1 Number of transformants from different starting materials

注: A: 受体为 PDA 平板上产生的孢子; B: 受体为 PDB 摇菌产生的孢子; C: 受体为 PDA 平板培养 24 h 的菌丝片段; D: 受体为 PDA 平板培养 48 h 的菌丝片段。

Note: A: Conidia from PDA; B: Conidia from PDB; C: 24-hour-old fungal hyphae; D: 48-hour-old fungal hyphae.

2.2 致病性缺陷型转化子筛选

采用离体古铜期橡胶树叶无伤接种法进行致病性缺陷转化子筛选, 从 3 721 个转化子中筛选得到致病性缺陷转化子 25 个。致病性正常转化子及野生菌接种 20 μ L 孢子悬浮液(1×10^6 个孢子/mL), 4 d 后在接种点外圈出现水浸状坏死斑, 且在病斑上长出白色菌丝及孢子, 接种的孢子悬浮液滴形成一层水膜附在接种点表面; 而致病性缺陷型转化子不形成坏死斑, 接种的孢子悬浮液滴滞留在接种部位, 叶片仍保持正常(图 2)。

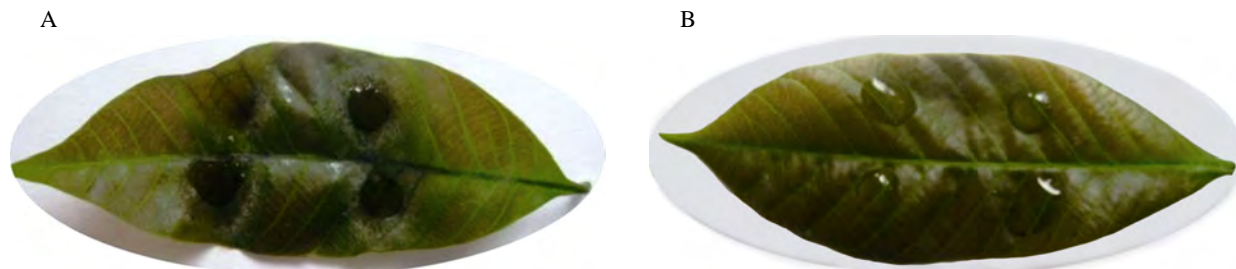


图2 胶孢炭疽野生菌及致病缺陷转化子的孢子悬浮液接种橡胶叶图

Fig. 2 Pathogenicity assay of *C. gloeosporioides* strains on detached leaves of the rubber tree

注: A: 接种野生型孢子悬浮液; B: 接种致病性缺陷转化子孢子悬浮液 4 d 后橡胶叶片。

Note: Copper-colour leaves were inoculated with the conidia suspension of the wild-type strain (A) and the mutant defective in pathogenicity (B). Leaves were photographed 4 days after inoculation.

2.3 转化子验证

随机选取 23 个转化子, 利用 PCR 技术检测外源 *GFP* 基因片段, 其中有 20 个转化子能扩增出 730 bp 大小的特异片段, 阳性转化子占总数 86.96%, 以质粒作阳性对照也能扩增出同样大小的条带, 而野生型菌株未扩增出特异条带(图 3)。进一步用奥林巴斯荧光共聚焦显微镜 FV1000 观察到阳性转化子的菌丝和孢子均有绿色荧光(图 4)。说明外源 *gfp* 基因能在胶孢炭疽菌中表达。

2.4 转化子遗传稳定性检测

随机选取 20 个阳性转化子接种到 PDA 培养基上, 28 $^{\circ}$ C 自然光照培养 6 d 后, 转接到 PDA 培养基上继代培养 10 次, 再接种到在含 100 mg/L 氯霉素磺隆的 DCM 培养基上, 28 $^{\circ}$ C 自然光照培养 6 d 后, 所选转化子均能长出菌落, 在荧光显微镜下仍观察到绿色荧光。表明外源导入基因能稳定遗传, 具遗传稳定性。

3 讨论

与传统的转化技术相比, ATMT 的优点之一是受体材料的多样性, 可以转化原生质体、菌丝、孢子及子实体等^[7,14-15]。本研究用菌丝片段及两种不同培养方式获得的孢子与根癌农杆菌共培养

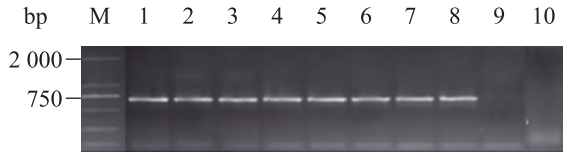


图3 *GFP* 基因 PCR 检测结果

Fig. 3 Fragments amplified by PCR using the *gfp* specific primers

注: M 为 DL2000 DNA Marker; 泳道 1-6 为转化子扩增产物; 泳道 7-8 为 pSULF-*gfp* 质粒扩增产物(阳性对照); 9-10 为野生菌扩增产物(阴性对照).

Note: Fragments amplified by PCR using the *gfp* specific primers with DNA from six *C. gloeosporioides* transformants obtained with AGL1 containing binary vectors pSULF-*gfp* (Lanes 1-6); M: DL2000 DNA marker (Bright bands are 750 bp); Lanes 7-8: pSULF-*gfp* containing *gfp* gene (Positive control for PCR with *gfp*-specific primers); Lanes 9-10: Wild type (Negative control).

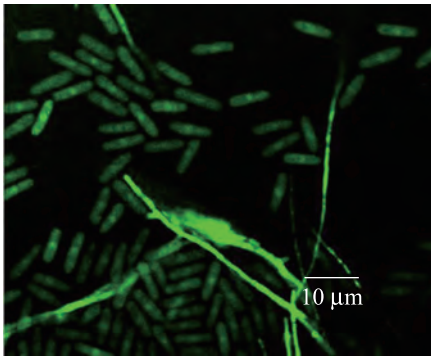


图4 转化子菌丝与孢子荧光显微观察

Fig. 4 Confocal image of the conidia and hyphae of *C. gloeosporioides* transformants expressing GFP

均能获得转化子,但孢子为受体的转化率比菌丝为受体的高,不同培养方法(PDA 和 PDB 培养)所产的孢子的转化率相当。胶孢炭疽菌在 PDA 固体培养, 25 °C, 12/12 h 光暗交替下培养,产孢少,所需时间约 7 d。而用 PDB 液体培养基, 25 °C, 12/12 h 光暗交替, 180 r/min 培养 4-5 d,能大量产孢,孢子悬浮液可存放 4 °C 冰箱 7 d 左右,不影响转化率,方便使用,简化操作。

转化受体和农杆菌的浓度均会影响转化效率^[16-17]。较高的受体孢子浓度会提高转化率。同样使用较高浓度的农杆菌也可以提高转化效率。

但这两个因素,最高使用浓度都有一定上限,受体真菌的孢子浓度过高则导致真菌的过量生长而不能挑出转化子;农杆菌浓度过高时由于农杆菌过度生长引起严重污染,也会导致转化率下降^[18-20]。在转化过程中发现,受体的活力同样影响转化效率。保存半年多的胶孢炭疽菌由于在非原生状态下保存,导致活力下降,共培养时竞争不过农杆菌,农杆菌生长过多,抑制炭疽菌的生长。

橡胶树叶片表面气孔的分布密度、结构、开口形状、叶表角质层和蜡质层厚度与抗病性密切相关。角质层是植物抵御病原物侵染的一道物理屏障^[21]。前期用带菌琼脂块接种预先刺伤的淡绿期橡胶叶,结果所有转化子均表现致病,与野生菌无差异。Bang Jau You 等报道 *PacCKLAP2* 缺失转化子接种到有伤口酸橙叶,其穿过叶表引起病斑在野生型和互补型上没有区别^[12]。为此通过实验摸索出致病性缺陷转化子筛选方法:初次筛选采用离体健康、无伤口古铜期或变色期的橡胶树叶片接种带菌琼脂块;对初筛得到致病缺陷的转化子,再用孢子悬浮液滴接种无伤口古铜期或变色期的橡胶树叶片,进而验证其致病性。

本研究采用 pSULF-*gfp* 二元载体不但含常规的抗生素抗性选择基因,还携带 *GFP* 报告基因构件。这个报告基因,由 *Aspergillus nidulans trpC* 基因启动子驱动其表达,因此阳性转化子既可以通过荧光显微镜观察检测,也可利用氯嘧磺隆抗性检测。此外还可以通过荧光共聚焦显微镜观察带 *GFP* 标签的致病性突变体在活体植物上的动态入侵过程,通过跟踪检测 *GFP* 的分布来研究病原真菌与植物之间的互作。*GFP* 作为一个有效的标记,可以用于病原菌在细胞间转移研究^[22]。

橡胶胶孢炭疽菌突变库建立是研究该病原菌致病机制的前提。前人研究的基础上,通过调整筛选培养基中氯嘧磺隆用量及受体培养方法,

稳定橡胶胶孢炭疽菌转化率, 本研究中化率为 150–400 个转化子/ 10^6 孢子, 基本与林春花等报导的相当, 高于方丽与日本学者 Tsuji 等^[10,20–23]的报导。构建含 3 721 多个橡胶胶孢炭疽菌插入突变体库, 并通过转化子的致病性筛选, 获得 25 个致病性缺陷转化子, 为后续的致病分子机理研究提供实验材料。下一步将运用 TAIL-PCR 技术克隆转化子 T-DNA 侧翼序列, 利用 Southern 杂交证实 T-DNA 插入拷贝数; 同时, 借助本研究室已开展的胶胞、尖孢炭疽菌基因组序列的测定, 开展相关基因的克隆与功能分析。

参 考 文 献

- [1] 刘秀娟, 杨业铜, 冷怀琼. 我国植胶垦区橡胶树炭疽病菌的种型鉴定[J]. 热带作物学报, 1987, 8(1): 93–101.
- [2] 张春霞, 何明霞, 李加智, 等. 云南西双版纳地区橡胶炭疽病原鉴定[J]. 植物保护, 2008, 34(1): 103–106.
- [3] 蔡志英, 黄贵修. 巴西橡胶树炭疽病研究进展[J]. 西南林业大学学报, 2011, 31(1): 89–93.
- [4] Rho HS, Kang S, Lee YH. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*[J]. Molecular Cells, 2001, 12(3): 407–411.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] de Groot MJA, Bundock P., Hooykaas PJJ, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16(9): 839–842.
- [8] Janyce AS, Yun CC, Kwon-Chung KJ. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 1798–1802.
- [9] 魏小慧, 林春花, 郑肖兰, 等. 利用启动子捕获技术构建橡胶炭疽病菌突变体库[J]. 热带作物学报, 2009, 30(6): 804–810.
- [10] 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.
- [11] Sesma A, Osbourn AE. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi [J]. Nature, 2004, 431(7008): 582–586.
- [12] You BJ, Choquer MC, Chung KR. The *Colletotrichum acutatum* gene encoding a putative pH-responsive transcription regulator is a key virulence determinant during fungal pathogenesis on citrus[J]. Molecular Plant Microbe Interaction, 2007, 20(9): 1149–1160.
- [13] Chung KR, Shilts TS, Li W, et al. Engineering a genetic transformation system for *Colletotrichum acutatum*, the causal fungus of lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 213(1): 33–39.
- [14] Chen X, Stone M, Schlaghauser C, et al. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4510–4513.
- [15] Dunn-Coleman N, Wang HM. *Agrobacterium* T-DNA: a silver bullet for filamentous fungi?[J]. Nature, Biotechnology, 1998, 16(9): 817–818.
- [16] 吕风青, 曾大兴, 涂国全. 炭疽菌的遗传转化及应用研究进展[J]. 深圳职业技术学院学报, 2009, 8(5): 68–73.
- [17] 张震, 杜新法, 柴荣耀, 等. 根癌农杆菌介导丝状真菌遗传转化因素的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(6): 88–91.
- [18] 黄亚丽, 潘玮, 蒋细良, 等. 根癌农杆菌介导丝

- 状真菌遗传转化的研究进展[J]. 生物技术通报, 2007(3): 111-114.
- [19] 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[J]. 植物保护学报, 2008, 35(5): 421-426.
- [20] 方丽, 刘海青, 宋凤鸣, 等. 农杆菌介导的黄瓜炭疽菌遗传转化[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2006, 32(4): 360-366.
- [21] 李茂, 蒋昌顺. 主要热带作物对炭疽病抗病机制研究进展[J]. 热带农业科技, 2008, 31(1): 45-52.
- [22] Khang CH, Berruyer R, Giraldo MC, et al. Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement[J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(14): 1388-1403.
- [23] Tsuji G, Fujii S, Fujihara N, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2003, 69(4): 230-239.



(上接 p.763)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

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

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 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。

4.2.3 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。

4.2.4 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

4.3.1 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, 作者登陆我刊系统也可查看。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陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 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。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

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 联系我们

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/swxwtbcn>