

根癌农杆菌介导的水稻纹枯病菌转化系统的建立

杨迎青[#] 杨 媚[#] 李明海 李 勇 贺晓霞 周而勋^{*}
(华南农业大学 植物病理学系, 广东 广州 510642; [#] 共同第一作者; ^{*} 通讯联系人, E-mail: exzhou@scau.edu.cn)

Establishment of *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation System for *Rhizoctonia solani* AG 1 A, the Causal Agent of Rice Sheath Blight

YANG Ying qing[#], YANG Mei[#], LI Ming hai, LI Yong, HE Xiao xia, ZHOU Er xun^{*}
(Department of Plant Pathology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; [#] These authors contributed equally to this paper; ^{*} Corresponding author, E-mail: exzhou@scau.edu.cn)

YANG Yingqing, YANG Mei, LI Minghai, et al. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system for *Rhizoctonia solani* AG 1 A, the causal agent of rice sheath blight. Chin J Rice Sci, 2010, 24(6): 617-622.
Abstract: In order to construct the T-DNA insertional mutagenesis transformation system for rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG 1 A, the virulent isolate GD118 of this pathogen was selected as the initial isolate for transformation. The conditions for the transformation of GD118 were optimized in 5 aspects, i.e. pre induction time, coculture time, acetosyringone concentration at coculture stage, coculture temperature and pH values of solid induction medium (SIM) at coculture phase. Finally, an *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT) system for *R. solani* AG 1 A was established successfully. The optimal conditions for this ATMT system are as follows: the concentration of hygromycin B at 30 µg/mL for transformant screening, 8 h of pre induction time, 20 h of coculture time, 200 µmol/L of acetosyringone in SIM at coculture stage, coculture temperature at 25 °C and pH 5.6 to 5.8 of SIM at coculture phase. The transformants still showed high resistance to hygromycin B after 5 generations' subcultures. Ten transformants were randomly picked out for PCR verification using the specific primers designed from the *hph* gene, and the results revealed that an expected band of 500 bp was amplified from all of the 10 transformants. Meantime, PCR amplification for these 10 transformants was carried out using specific primers designed from the *Vir* gene of *A. tumefaciens*, with 4 strains of *A. tumefaciens* as positive controls for eliminating the false positive caused by *A. tumefaciens* contamination, and the results showed that an expected band of 730 bp could be amplified from the 4 strains of *A. tumefaciens*, whereas no corresponding DNA band could be amplified from the 10 transformants. The results of above two PCR amplifications clearly showed that T-DNA was indeed inserted into the targeted isolate GD118.
Key words: rice sheath blight; *Rhizoctonia solani*; *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation; T-DNA insertional mutagenesis; methodology

杨迎青, 杨 媚, 李明海, 等. 根癌农杆菌介导的水稻纹枯病菌转化系统的建立. 中国水稻科学, 2010, 24(6): 617-622.
摘 要: 为建立水稻纹枯病菌的 T-DNA 插入诱变转化系统, 以水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani* AG 1 A) 强致病力菌株 GD118 为转化的初始菌株, 从预诱导时间、共培养时间、共培养时乙酰丁香酮的浓度、共培养温度和共培养时固体诱导培养基 (SIM) 的 pH 值等 5 个方面对转化条件进行了优化, 成功地建立了适合于水稻纹枯病菌根癌农杆菌介导转化 (ATMT) 的优化系统。这个优化系统的转化条件如下: 以 30 µg/mL 的潮霉素 B 作为转化子的筛选浓度, 预诱导 8 h, 共培养 20 h, 共培养时固体诱导培养基上的乙酰丁香酮浓度为 200 µmol/L, 共培养温度 25 °C, 共培养时固体诱导培养基 pH 5.6~5.8。采用这个系统筛选到的转化子继代培养 5 代后, 在含 30 µg/mL 潮霉素 B 的 PDA 平板上仍表现明显的抗性。从得到的转化子中随机抽取 10 个, 利用根据抗潮霉素 *hph* 基因设计的特异性引物进行 PCR 扩增, 转化子均能扩增出 500 bp 左右的预期条带; 与此同时, 以 4 个根癌农杆菌作为阳性对照, 用根癌农杆菌 *Vir* 基因特异引物对转化子进行 PCR 扩增, 以排除转化子受农杆菌污染所致的假阳性, 结果表明: 4 个根癌农杆菌均能扩增出 *Vir* 基因条带 (730 bp), 而 10 个转化子均未能扩增出相应条带。以上两个 PCR 扩增的实验结果清楚地表明, T-DNA 已经插入到目标菌株 GD118 中。
关键词: 水稻纹枯病; 立枯丝核菌; 根癌农杆菌介导转化; T-DNA 插入诱变; 方法
中图分类号: Q933; S435.111.4+2 文献标识码: A 文章编号: 1001-7216(2010)06-0617-06

水稻纹枯病是一种世界性病害, 为水稻三大病害之一^[1-2]。随着高产、矮秆、多穗良种的推广以及种植密度和施氮量的增加, 其危害日趋严重, 在我国尤其是南方造成了严重的经济损失^[3-5]。水稻纹枯病的病原菌为立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn), 是一种土壤习居菌, 分布范围和寄主范围广, 除危害水稻外, 还可危害玉米、大豆、马铃薯、番茄、黄瓜和甘蓝等 260 多种植物^[2, 6-7]。由于立枯

收稿日期: 2010-02-07; 修改稿收到日期: 2010-03-24。
基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项经费资助项目 (nyhyzx3-16 原 nyhyzx07-049)。

丝核菌 (*R. solani*) 种内成员复杂, 故被认为是一个复合种^[8], 种内通常采用菌丝融合群 (anastomosis group, AG) 进行再分类^[9]。目前立枯丝核菌至少被划分为 14 个 AG, 有些 AG 再根据寄主范围、致病性、同工酶谱和分子生物学特征等划分为不同的亚群^[10], 水稻纹枯病菌属于 AG 1 群的 A 亚群, 即 *R. solani* AG 1 A^[9-10]。近年来, 随着分子生物学向植物病理学的渗透和发展, 真菌的遗传转化也越来越受到重视, 因为转化是获得所需筛选基因的一种简单方法。目前至少已有 100 种丝状真菌实现了遗传转化^[11]。真菌遗传转化的方法有多种, 其中的根癌农杆菌介导的转化法 (*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation, ATMT) 是近年来发展起来的一种新方法, 与其他方法相比, 该方法具有操作简便、转化效率高和单拷贝率低等特点, 因而成为真菌遗传转化和基因克隆的强有力工具^[12-16]。在立枯丝核菌的遗传转化方面, Robinson 等^[17]利用 PEG 诱导整合技术对立枯丝核菌进行了转化, 并得到了一些转化子, 但这些转化子不能正常生长, 他们认为立枯丝核菌的转化同其他一些担子菌一样, 存在瞬时转化 (transient transformation) 现象。Wu 等^[16]利用 ATMT 方法尝试了对立枯丝核菌 3 个融合群 AG 3、AG 4 和 AG 6 的转化, 仅融合群 AG 6 的转化获得了成功, 而对融合群 AG 3 和 AG 4 的转化未取得成功。水稻纹枯病是水稻上的重要病害之一, 但水稻纹枯病菌 (*R. solani* AG 1 A) 这个融合群的遗传转化系统目前国内外尚未见报道。本研究拟利用 ATMT 方法, 对水稻纹枯病菌进行遗传转化, 构建该病菌的 T-DNA 插入诱变转化系统, 旨在为该病菌的致病机制研究、致病相关基因克隆以及为寻求控制该病害的有效途径奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与质粒

供试菌株为本实验室保存的水稻纹枯病菌 (*R. solani* AG 1 A) 强致病力菌株 GD118; 含潮霉素抗性基因的质粒 pTHPR1 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) AGL-1 菌株由新加坡分子与细胞生物学院 (IMCB) 张炼辉教授惠赠; 根癌农杆菌菌株 EHA105、MP90、LBA4404 由本实验室保存。

1.2 生化试剂

潮霉素 B (Hygromycin B) 购自 Roche 公司 (德

国); DNA 提取试剂盒及 PCR 试剂购自 TaKaRa 公司 (日本); 乙酰丁香酮 (Acetosyringone, 简称 AS) 购自 Sigma 公司 (美国); MES 购自 Sigma 公司 (美国); 细菌基因组 DNA 购自天根生化科技有限公司; 其他常用药品均为国产分析纯级别试剂。

1.3 水稻纹枯病菌对潮霉素 B 的敏感性检测

在 PDA 中加入适量的潮霉素 B, 调节浓度, 使潮霉素 B 的终浓度依次为 0、5、10、15、20 和 25 $\mu\text{g/mL}$, 每个浓度 3 个重复。野生型菌株 (GD118) 生长 36 h 后, 用直径 5 mm 的打孔器在其菌落边缘打取菌丝块, 然后将菌丝块接种到各种浓度的潮霉素平板上, 26 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 8 d。为了进一步确定潮霉素的筛选浓度, 将 PDB 液体培养基培养 36 h 的菌丝研磨碎后, 加无菌水配成悬浮液, 涂布在含潮霉素的 PDA 平板上, 潮霉素 B 的终浓度分别为 0、5、10、15、20、25、30 和 35 $\mu\text{g/mL}$ 共 8 个梯度, 每个梯度 3 个重复, 26 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 8 d 后观察其生长状况。

1.4 转化方法

参考 Mullins 等^[12]的方法, 稍加修改。将具质粒 pTHPR1 的农杆菌菌株 AGL-1 置于 3 mL 含有壮观霉素 (终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$) 和利福平 (终浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$) 的矿物质培养液 (minimal medium, MM) 中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 48 h, 然后用诱导培养液 (induction medium, IM) 稀释, 使其 OD₆₀₀ 值至 0.15 左右, 28 $^{\circ}\text{C}$ 下预诱导培养 8 h, 当所测 OD₆₀₀ 值约为 0.3 左右时, 即可用于共培养。将水稻纹枯病菌 GD118 菌株在含氨苄青霉素 (终浓度 50 $\mu\text{g/mL}$) 的 PDB 培养液中培养 36 h 后, 取出少许, 用研磨棒充分磨碎后, 用血球计数板粗测菌丝碎段含量, 用无菌水稀释至每 1 mL ddH₂O 中大约含 10⁷ 段菌丝碎段。然后取 100 μL 与预诱导的农杆菌 AGL-1 菌株 100 μL 在固体诱导培养基 (SIM) (含 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 AS) 上进行共培养。共培养 20 h 后, 将混合纤维素膜 (孔径 0.45 μm) 转到含有潮霉素 B (终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$) 和头孢霉素 (终浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$) 的 PDA 平板上。26 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 6 d, 在含有潮霉素 B (终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$) 和头孢霉素 (终浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$) 的 PDA 平板上进行复筛。将经过复筛得到的转化子保存于低温冰箱中, 备用。

1.5 不同因素对转化效率的影响

按照上述初始转化方法, 按照预诱导时间 (4、6、8、10、12 h)、共培养时间 (12、16、20、24、36 h)、共培养时乙酰丁香酮的浓度 (0、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$)、共培养温度 (22 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、28 $^{\circ}\text{C}$ 、31 $^{\circ}\text{C}$ 、34 $^{\circ}\text{C}$)、共培养

时 SIM 培养基的 pH 值 (5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4) 等影响转化效率的主要因子 ,逐一进行单因子条件试验。其中 ,后续因子的优化是在前面因子已确定的最优条件下进行的。每个处理设 3 个重复 ,用 SAS 软件进行差异显著性分析。

1.6 转化子的 PCR 检测

随机挑取 10 个复筛转化子 ,用 TaKaRa 公司的 Universal DNA Extraction Kit 提取野生型菌株和转化子菌株基因组 DNA ,农杆菌基因组 DNA 用天根生化科技有限公司的细菌基因组提取试剂盒进行提取。

以双元载体 pTHPR1 上的潮霉素磷酸转移酶基因 (*hph*) 为模板分别设计特异引物 *hph*F (5-GCAAGACCTGCCTGAAACCG 3') 和 *hph*R (5-GGTCAAGACCAATGCGGAGC 3')。扩增体系为 25 μ L ,PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 下 2 min ;94 $^{\circ}$ C 下 40 s ;56 $^{\circ}$ C 下 40 s ;72 $^{\circ}$ C 下 1 min (30 个循环) ;72 $^{\circ}$ C 下 10 min。

为排除转化子表面黏附根癌农杆菌而导致假阳性的出现 ,用 Sawada 等^[18] 设计的农杆菌的 *Vir* 基因的特异引物 VCF (5-ATCATTTGTAGCGACT-3') 和 VCR (5-AGCTCAAACCTGCTTG-3') 进行 PCR 扩增 ,以 4 个根癌农杆菌菌株 (AGL-1、EHA105、MP90 和 LBA4404) 为阳性对照 ,对 10 个转化子基因组 DNA 进行 *Vir* 基因检测。PCR 扩增体系为 25 μ L ,扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 下 2.5 min ;95 $^{\circ}$ C 下 1 min ;55 $^{\circ}$ C 下 1 min ;72 $^{\circ}$ C 下 2 min (40 个循环) ;72 $^{\circ}$ C 下 7 min。

1.7 转化子的稳定性实验

随机挑选 10 个转化子 ,接种到不含潮霉素的 PDA 培养基中 ,25 $^{\circ}$ C 下培养 36 h ,于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存 10 d 后 ,再移植到 PDA 培养基中。按以上方法重复 4 次 ,将第 5 代转化子接种到含潮霉素 (30 μ g/mL) 的 PDA 培养基中 ,26 $^{\circ}$ C 下培养 36 h ,观察转化子的生长情况。

2 结果与分析

2.1 水稻纹枯病菌对潮霉素 B 的敏感性

培养 8 d 后 ,菌丝块接种的处理在潮霉素浓度 25 μ g/mL 下没有生长 ,而不含潮霉素的对照菌落早就长满整个培养皿并已长出菌核 ;在菌丝碎段涂布的处理中 ,20 μ g/mL 潮霉素浓度下也没有菌落长出 ,与菌丝块的一样 ,不含潮霉素的对照菌落也早就长满整个培养皿并已长出菌核。因此 ,确定 30

μ g/mL 的潮霉素浓度作为后面实验转化子的筛选浓度。

2.2 预诱导时间对转化效率的影响

预诱导时间分别设置 4、6、8、10 和 12 h ,然后分别测定各个预诱导时间下 IM 培养液的 OD₆₀₀ 值 ,并按前面已经确定的转化方法进行转化。结果发现 ,预诱导 8 h 后转化效率达到最佳 ,此时农杆菌的 OD₆₀₀ 为 0.27 ,而共培养 12 h 时农杆菌的 OD₆₀₀ 达到 0.32 (图 1-A)。所以 ,预诱导农杆菌的 OD₆₀₀ 值至 0.3 左右是比较适合进行转化的。从图 1-A 可看出 ,尽管预诱导时间 10 h 和 12 h 的转化子数量比 8 h 的都要多一些 ,前两者与后者之间差异并不显著。综合考虑一些其他方面的因素 ,确定以 8 h 为最佳预诱导时间。

2.3 共培养时间对转化效率的影响

分别设置 12、16、20、24 和 36 h 等 5 个共培养时间 ,研究结果显示 (图 1-B) ,20 h 后 ,共培养时间对转化效率影响的差异不显著。尽管 24 h、36 h 的转化子数量都比 20 h 的要多一些 ,但考虑到节约时间及其他一些因素 ,确定以 20 h 为水稻纹枯病菌的最佳共培养时间。

2.4 共培养时 AS 浓度对转化效率的影响

分别设置 0、100、200、400 μ mol/L 共 4 个 AS 浓度 ,结果发现 ,AS 浓度达到 200 μ mol/L 时 ,水稻纹枯病菌的转化效率趋于稳定 (图 1-C)。从图 1-C 中可看出 ,尽管 AS 浓度为 400 μ mol/L 的转化子数量比 200 μ mol/L 的稍多一些 ,但两者差异不显著。从经济、节约的角度考虑 ,以 200 μ mol/L 为 AS 的最佳共培养浓度。

2.5 共培养温度对转化效率的影响

分别设置 22 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、31 $^{\circ}$ C 和 34 $^{\circ}$ C 共 5 个温度 ,结果表明 ,25 $^{\circ}$ C 的转化子数量达到最高峰 ,随后转化子数量开始下降。因此 ,25 $^{\circ}$ C 是最佳的共培养温度 (图 1-D)。

2.6 共培养 pH 值对转化效率的影响

分别配制 5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2 和 6.4 共 7 个 pH 值的 SIM 培养基 ,进行共培养 ,并用前面优化的最佳条件进行转化。结果表明 ,在 pH 5.6 ~ 5.8 的 SIM 培养基上进行共培养时 ,转化效率达到最高 (图 1-E)。

2.7 转化子的 PCR 鉴定

以随机挑取的 10 个转化子与野生型菌株 (GD118) 的基因组 DNA 和 pTHPR1 质粒 DNA 为模板 ,用 *hph*F/R 特异引物 PCR 扩增 *hph* 基因片

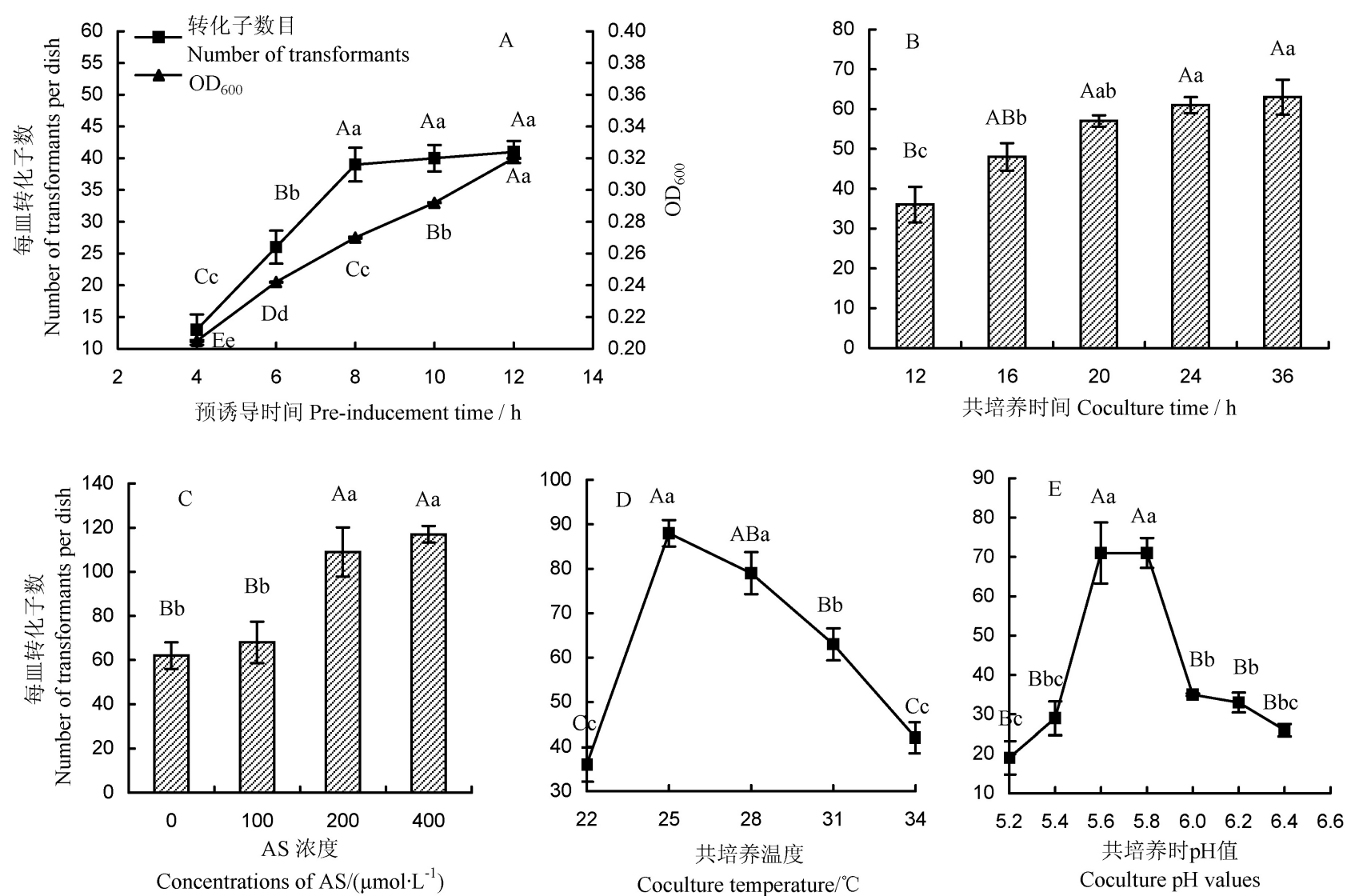


图 1 5 种因素对转化效率的影响
Fig.1 . Effects of five factors on the transformation efficiency .
图中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误。采用 Duncan 氏新复极差法 (DMRT) 进行差异显著性分析。标准差线上方 (或下方) 具有不同大小写字母者表示在 1% 水平 (P = 0.01) 和 5% 水平 (P = 0.05) 上差异显著。
A - 预诱导时间对转化效率的影响 ; B - 共培养时间对转化效率的影响 ; C - 共培养时 AS 浓度对转化效率的影响 ; D - 共培养温度对转化效率的影响 ; E - 共培养时 pH 值对转化效率的影响。
Data in this figure , representing the mean ± SE of three replicates , were analyzed for significant difference by using Duncan s Multiple Range Test (DMRT) . Different uppercase and lowercase letters above bars indicate significant difference at 1% level (P = 0.01) and 5% level (P = 0.05) , respectively .
A , Effect of pre induction time on the transformation efficiency ; B , Effect of coculture time on the transformation efficiency ; C , Effect of concentrations of acetosyringone (AS) on the transformation efficiency during coculture ; D , Effect of temperature on the transformation efficiency during coculture ; E , Effect of pH on the transformation efficiency during coculture .

段 结果表明 10 个转化子和 *hph* 基因阳性对照 (pTHPR1 质粒 DNA) 均能扩增出 500 bp 的预期条带 (图 2 A)。为排除农杆菌可能黏附在转化子菌丝上而使提取的转化子基因组 DNA 被农杆菌基因组 DNA 玷污的情况 , 本研究用 4 个农杆菌菌株 AGL-1、EHA105、MP90 和 LBA4404 作 *Vir* 基因阳性对照 , 分别扩增 10 个转化子和野生型菌株 (GD118) 的 *Vir* 基因。结果表明 野生型菌株和 10 个转化子均呈阴性 (图 2 B) , 即提取的转化子基因组 DNA 无农杆菌 DNA 污染。由以上 *hph* 基因 PCR 扩增和 *Vir* 基因 PCR 扩增两个实验 , 可以得出结论 : 随机挑取的 10 个转化子均已有 T-DNA 插入 , 本研究建立的转化系统能够成功有效地进行水稻纹枯病菌的遗传转化。

2.8 转化子的稳定性

随机选取 10 个转化子在无潮霉素 B 选择压力

下连续转接 5 代 , 然后转接到含潮霉素 B 的 PDA 培养基上培养 36 h 后 , 菌落直径达到 7 ~ 8 cm , 表明这些转化子仍具有对潮霉素 B 的抗性 , 外源 T-DNA 已经整合到水稻纹枯病菌的基因组中 , 而且能够稳定遗传。

3 讨论与结论

到目前为止 , 国内外尚无关于水稻纹枯病菌 (*R. solani* AG-1 A) 遗传转化的报道 , 本研究成功地建立了适合于水稻纹枯病菌进行 ATMT 遗传转化的系统 , 研究结果无疑将对水稻纹枯病菌的致病机制和致病相关基因的研究起到推动作用。

在预诱导时间方面 , 有学者在对尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 转化时采用 6 h 预诱导时间 [12-15]。而本研究通过预诱导时间的梯度实验得出结论 : 预诱导 8 h 是比较适合进行水稻纹枯病菌转

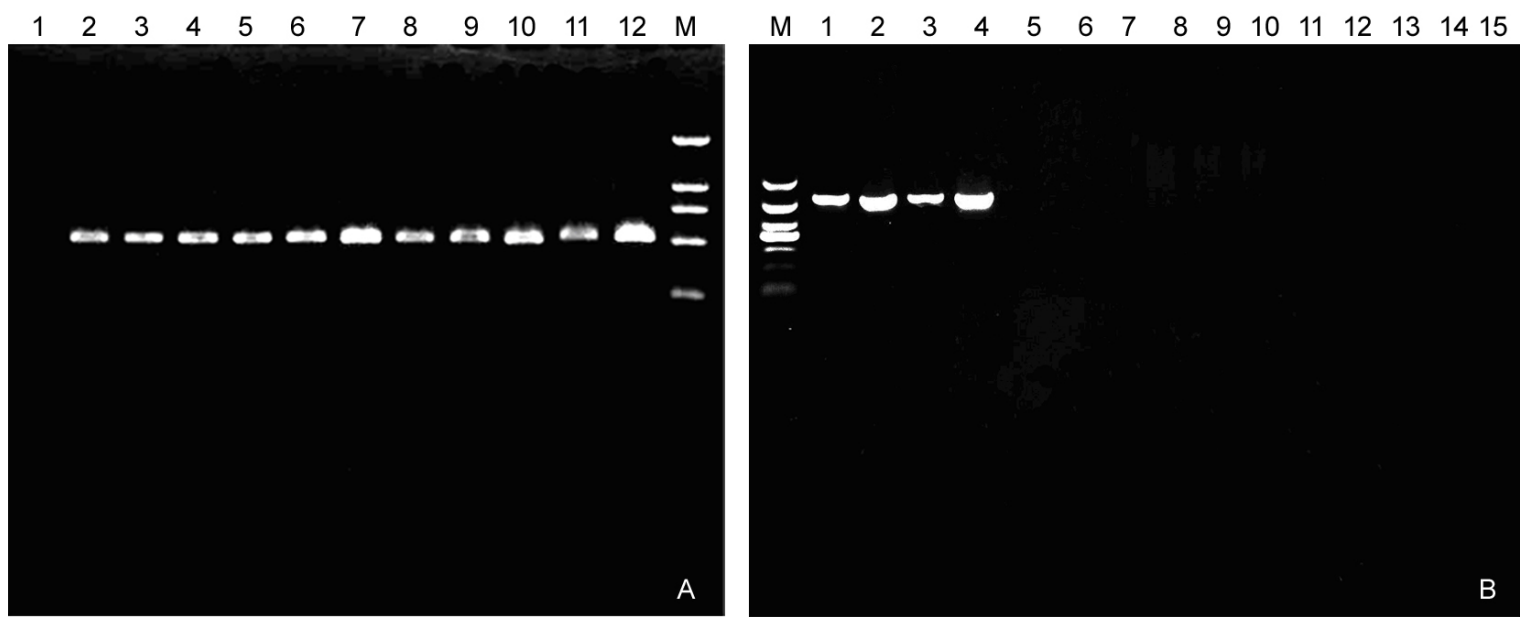


图 2 *hph*基因引物和 *Vir* 基因引物转化子 PCR 扩增鉴定

Fig. 2 . PCR amplification of genomic DNA from transformants .

A : 1 - 野生型菌株 (GD118) ; 2 ~ 11 - 随机挑取的 10 个转化子 ; 12 - pTHPR1 质粒 ; M - DL2000。
B : M - DL1000 ; 1 ~ 4 - 分别是农杆菌 AGL- 1、EHA105、MP90 和 LBA4404 ; 5 ~ 14 - 随机挑取的 10 个转化子 ; 15 - ddH₂O。
A : Lane 1 , Wild type isolate (GD118) ; Lanes 2 to 11 , Randomly selected transformants ; Lane 12 , pTHPR1 ; M , DL2000 .
B : M , DL1000 ; Lanes 1 to 4 , AGL- 1 ; Lane 2 , EHA105 ; Lane 3 , MP90 ; Lane 4 , LBA4404 ; Lanes 5 to 14 , Randomly selected transformants ; Lane 15 , ddH₂O .

化的 ,多于 8 h 的预诱导时间 (8 ~ 12 h) 对转化效率的提高没有显著影响。

在共培养时间方面 ,本研究通过实验得出转化效率随共培养时间的增加而提高 ,此结果支持了 Combier 等^[13]、李敏慧等^[15] 和 Tsuji 等^[19] 的观点。Meyer 等^[20] 对巨大曲霉 (*Aspergillus giganteus*) 的研究结果表明 ,共培养时间小于 24 h 或大于 72 h 都没有转化子产生 ;李敏慧等^[15] 和 Takahara 等^[21] 认为 ,共培养时间超过 48 h ,香蕉枯萎病菌菌丝生长过量 ,则很难挑出单菌落转化子 ,况且共培养时间长 ,容易导致转化子出现多拷贝和假阳性 ,将最佳共培养时间确定为 48 h。本研究通过实验证明 ,对于水稻纹枯病菌的转化 ,12 h 的共培养时间就能取得较高转化效率 ,共培养 20 h 时达到最高。由于水稻纹枯病菌生长速率较快 ,超过 36 h ,它就会过度生长 ,未转膜前就已有大量菌丝长出。因此 ,共培养时间不能超过 36 h ,这与大多数真菌的转化不同^[15 , 20 21]。

在共培养时 AS 浓度的选择方面 ,普遍认为根癌农杆菌与真菌共培养时 AS 的有无及浓度对转化效率和转化子拷贝数有影响。共培养过程中 ,没有 AS 就没有转化子出现 ,AS 浓度增加 ,转化效率也相应提高^[13 15 , 21 24]。本研究认为共培养时不加 AS 也能得到较高的转化效率 ,这与大多数真菌的转化不同^[13 15 , 21 24]。但加 AS 会提高转化效率 ,当 AS 浓度达到 200 μmol/L 时 ,继续增加 AS 浓度对

转化效率影响不大 ,即 200 μmol/L 是共培养时 AS 加入的最佳浓度 ,这点与大多数学者观点一致^[13 15 , 21 24]。

在共培养时固体诱导培养基的 pH 值方面 ,李敏慧等^[15] 认为最适的 pH 值是 5.5 ,并不是农杆菌 AGL- 1 生长的最佳 pH 值。本研究通过单因素梯度实验得出结论 :pH 5.6 ~ 5.8 的固体诱导培养基是最适合进行水稻纹枯病菌转化的。Turk 等^[25] 认为 ,共培养基的 pH 值能够影响农杆菌 VirA 蛋白表达 ,从而影响 T- DNA 的转移。Rogowsky 等^[26] 和 Stachel 等^[27] 的研究认为 ,不同类型的农杆菌 ,VirA 蛋白表达活性最高的 pH 值范围介于 5.3 ~ 5.8 ,高于 5.8 或低于 5.3 时 ,T- DNA 转移活性明显降低。因此 ,根据 Rogowsky 等^[26] 和 Stachel 等^[27] 的结论 ,本研究得到的最适宜于水稻纹枯病菌转化的共培养基 pH 值 (5.6 ~ 5.8) 在 VirA 蛋白表达活性的范围内 (pH 5.3 ~ 5.8)。

在立枯丝核菌 (*R. solani*) 其他融合群的转化方面 ,Robinson 等^[17] 利用 PEG 诱导整合技术 ,先后利用从构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 获得的质粒 pES200 和寄生隐球丛赤壳 (*Cryphonectria parasitica* ,即板栗疫病菌) 获得的质粒 pAXHY2 对 *R. solani* AG 3 融合群进行了转化 ,并得到了一些突变体 ,但这些突变体生长到一定大小的菌落后均停止生长 ,Southern 杂交结果证明插入的是不完整的载体 ,未产生快速生长基因。他们认为 *R. so*

lani 的转化同其他一些担子菌一样,存在瞬时转化 (transient transformation) 现象。Wu 等^[16] 利用 ATMT 方法尝试了 *R. solani* AG 3、AG 4 和 AG 6 等 3 个融合群的转化,仅 AG 6 融合群的转化获得了生长正常的 5 个转化子,而对 AG 3 和 AG 4 融合群的转化未取得成功。对于水稻纹枯病菌 (*R. solani* AG 1- A) 这个融合群的菌株则尚未见到转化成功的报道。本研究建立的转化系统,为水稻纹枯病菌的致病机制和相关基因的克隆与功能分析研究奠定了基础,有利于水稻纹枯病致病相关基因的进一步深入研究。

谢辞:本研究使用的含潮霉素抗性基因的质粒 pTHPR1 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) AGL-1 菌株由新加坡分子与细胞生物学院 (IMCB) 张炼辉教授 (Prof. Lian Hui Zhang) 惠赠,在此表示衷心的感谢!

参考文献:

[1] Lee F N , Rush M C . Rice sheath blight : A major rice disease . *Plant Dis* , 1983 , 67 (7) : 829-832 .

[2] 彭绍裘 , 曾绍瑞 , 张志光 . 水稻纹枯病及其防治 . 上海 : 上海科学技术出版社 , 1986 .

[3] 周而勋 , 曹菊香 , 杨 媚 , 等 . 我国南方六省 (区) 水稻纹枯病菌遗传多样性的研究 . 南京农业大学学报 , 2002 , 25 (3) : 36-40 .

[4] 周而勋 , 杨 媚 , 陈友林 . 土壤环境因素对水稻纹枯病菌腐生定殖能力的影响 . 植物病理学报 , 2002 , 32 (3) : 214-218 .

[5] 黄世文 , 王 玲 , 陈惠哲 , 等 . 氮肥施用量和施用方法对超级杂交纹枯病发生的影响 . 植物病理学报 , 2009 , 39 (1) : 104-109 .

[6] 肖 勇 , 刘明伟 , 李 刚 , 等 . 四川省水稻立枯丝核菌的遗传分化与致病力 . 中国水稻科学 , 2008 , 22 (1) : 87-92 .

[7] 黄江华 , 杨 媚 , 周而勋 , 等 . 13 种植物丝核菌对水稻、甜玉米、黄瓜和甘蓝的交互致病性 . 华中农业大学学报 , 2008 , 27 (2) : 198-203 .

[8] Cubeta M A , Vilgalys R . Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex . *Phytopathology* , 1997 , 87 : 480-484 .

[9] Ogoshi A . Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn . *Ann Rev Phytopathol* , 1987 , 25 : 125-143 .

[10] Stodart B J , Harvey P R , Neate S M , et al . Genetic variation and pathogenicity of anastomosis group 2 isolates of *Rhizoctonia solani* in Australia . *Mycol Res* , 2007 , 111 : 891-900 .

[11] 王政逸 , 李德葆 . 限制酶介导的遗传转化及其在丝状真菌中的应用 . 菌物系统 , 2001 , 20 (1) : 142-147 .

[12] Mullins E D , Kang S . Transformation : A tool for studying fungal pathogens of plants . *Cell Mol Life Sci* , 2001 , 58 : 2043-2052 .

[13] Combiér J P , Melayah D , Raffier C , et al . *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* . *FEMS Microbiol Lett* , 2003 , 220 (1) : 141-148 .

[14] Michielse C B , Hooykaas P J J , van den Hondel C A , et al . *Agrobacterium* mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi . *Curr Genet* , 2005 , 48 (1) : 1-17 .

[15] 李敏慧 , 张 荣 , 姜大刚 , 等 . 根癌农杆菌介导的香蕉枯萎病菌 4 号生理小种的转化 . 植物病理学报 , 2009 , 39 (4) : 405-412 .

[16] Wu J , O'Brien P A . Stable transformation of *Rhizoctonia solani* with a modified hygromycin resistance gene . *Australas Plant Pathol* , 2009 , 38 : 79-84 .

[17] Robinson H L , Deacon J W . Protoplast preparation and transient transformation of *Rhizoctonia solani* . *Mycol Res* , 2001 , 105 (11) : 1295-1303 .

[18] Sawada H , Ieki H , Matsuda I . PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains . *Appl Environ Microbiol* , 1995 , 61 (2) : 828-831 .

[19] Tsuji G , Fujii S , Fujihara N , et al . *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium* . *J General Plant Pathol* , 2003 , 69 (4) : 230-239 .

[20] Meyer V , Mueller D , Strowig T , et al . Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus* . *Curr Genet* , 2003 , 43 (5) : 371-377 .

[21] Takahara H , Tsuji G , Kubo Y , et al . *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii* . *J General Plant Pathol* , 2004 , 70 (2) : 93-96 .

[22] Rogers C W , Challen M P , Green J R , et al . Use of REMI and *Agrobacterium* mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus , *Coniothyrium mini-tans* . *FEMS Microbiol Lett* , 2004 , 241 (2) : 207-214 .

[23] 迟 彦 , 周东坡 , 平文祥 , 等 . 根癌农杆菌介导的真菌遗传转化及其应用 . 菌物学报 , 2005 , 24 (4) : 612-619 .

[24] Samils N , Elfstrand M , Czederpiltz D L , et al . Development of a rapid and simple *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system for the fungal pathogen *Heterobasidion annosum* . *FEMS Microbiol Lett* , 2006 , 255 (1) : 82-88 .

[25] Turk S C H J , Melchers L S , Dulk Ras H D , et al . Environmental conditions differentially affect *vir* gene induction in different *Agrobacterium* strains : Role of the Vir A sensor protein . *Plant Mol Biol* , 1991 , 16 : 1051-1059 .

[26] Rogowsky P M , Close T J , Chimera J A , et al . Regulation of the *vir* genes of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTi C58 . *J Bacteriol* , 1987 , 169 (11) : 5101-5112 .

[27] Stachel S E , Zambryski P C . *Agrobacterium tumefaciens* and the susceptible plant cell : A novel adaptation of extracellular recognition and DNA conjugation . *Cell* , 1986 , 47 (2) : 155-157 .