

引文格式: 张峰程, 张君, 李凡, 等. 不同交配型拟轮枝镰孢菌荧光蛋白标记菌株的构建[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(1): 35-43. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202303024](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202303024)

不同交配型拟轮枝镰孢菌荧光蛋白 标记菌株的构建*

张峰程^{1,2}, 张君^{2,3}, 李凡^{1**}, 郭维^{2**}

(1. 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201; 2. 中国农业科学院 农产品加工研究所, 北京 100193;
3. 中国农业科学院 植物保护研究所, 北京 100193)

摘要:【目的】构建不同交配型的拟轮枝镰孢菌(*Fusarium verticillioides*)荧光蛋白标记菌株, 为研究拟轮枝镰孢菌的侵染、定殖、有性生殖等提供基础材料。【方法】通过聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的原生质体转化法分别将荧光蛋白基因 *eGFP* 和 *mCherry* 导入不同交配型的拟轮枝镰孢菌 FvLNF15-11 和 FvSHF19-37 菌株, 并比较荧光标记菌株与野生型菌株间的生长特性、有性生殖和致病力差异。【结果】经 PCR 检测获得了带有荧光标记的菌株, 激光共聚焦显微镜观察表明 *eGFP* 基因和 *mCherry* 基因分别在 FvLNF15-11 和 FvSHF19-37 菌株的分生孢子和菌丝中成功表达。与野生型菌株相比, 荧光标记菌株的生长发育、子囊壳形成和致病力均无明显差异。【结论】构建了拟轮枝镰孢菌不同交配型 *eGFP* 和 *mCherry* 荧光标记菌株, 不仅为研究拟轮枝镰孢菌在寄主体内的侵染、定殖等提供了材料, 也为研究该菌的有性生殖过程积累了基础。

关键词: 拟轮枝镰孢菌; PEG 介导; 绿色荧光蛋白; 红色荧光蛋白; 交配型

中图分类号: S435.131.49 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X(2024)01-0035-09

Construction of Fluorescent Protein Labeled *Fusarium verticillioides* with Different Mating Types

ZHANG Fengcheng^{1,2}, ZHANG Jun^{2,3}, LI Fan¹, GUO Wei²

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: [Purpose] To construct fluorescent protein labeled strains of *Fusarium verticillioides* with different mating types, providing materials for the study of infection, colonization, and sexual reproduction of *F. verticillioides*. [Methods] Through polyethylene glycol (PEG)-mediated protoplast transformation, the coding region of *eGFP* and *mCherry* fluorescent protein were introduced into *F. verticillioides* strains FvLNF15-11 and FvSHF19-37, respectively; the growth characteristics, sexual reproduction, and pathogenicity of fluorescently labeled strains were compared with the wild-

收稿日期: 2023-03-13

修回日期: 2024-01-31

网络首发日期: 2024-03-07

*基金项目: 国家自然科学基金项目(32072377)。

作者简介: 张峰程(1996—), 男, 云南丽江人, 在读硕士研究生, 主要从事拟轮枝镰孢菌致病机理研究。

E-mail: ZFC18387164437@163.com

**通信作者 Corresponding authors: 李凡(1970—), 男, 云南凤庆人, 博士, 教授, 主要从事植物病理学研究。E-mail: fanli@ynau.edu.cn; 郭维(1979—), 男, 山西太原人, 博士, 研究员, 主要从事植物健康与食品安全、病原真菌效应蛋白、真菌毒素合成调控机制和微生物资源开发与利用等研究。E-mail: guowei01@caas.cn

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20240306.1826.001>



type strain. [Results] The fluorescently labeled strains FvLNF15-11-eGFP and FvSHF19-37-mCherry were obtained through PCR test. The *eGFP* and *mCherry* were successfully expressed in conidia and mycelia of strain FvLNF15-11 and FvSHF19-37 under confocal laser microscopy, respectively. Between fluorescently labeled strains and the wild-type strain, there were no obvious differences in vegetative growth, perithecium production, and pathogenicity. [Conclusion] This study constructs the fluorescent protein labeled strains of *F. verticillioides* with different mating types, which not only provides material for studying the fungal infection and colonization in the host, but also accumulates a foundation for studying the sexual reproduction of *F. verticillioides*.

Keywords: *Fusarium verticillioides*; PEG-mediated; green fluorescent protein; red fluorescent protein; mating type

玉米不仅是中国的主要粮食作物之一，也是重要的饲料原料和工业原料，在国民经济中发挥着重要作用。随着全球气候变暖、秸秆还田、栽培模式的改变和品种的更换，玉米病虫害在中国呈持续高发趋势，已成为制约中国玉米高产稳产的重要限制性因素之一^[1]。玉米茎、穗腐病是一种在全球范围内普遍发生的病害，拟轮枝镰孢菌 (*Fusarium verticillioides*) 是引起该病害的主要病原菌之一，该菌可以在玉米整个生育期进行侵染。拟轮枝镰孢菌可以通过带菌种子或土壤中的病菌进入初生根，从地下部开始侵染，并向上进入植株茎基部^[2-3]；其分生孢子也可以通过气流到达花丝进而侵染玉米穗部，或落到叶鞘缝隙处侵染玉米茎节或叶鞘组织^[4]。拟轮枝镰孢菌在造成玉米减产的同时还产生多种真菌毒素，在玉米生产、收获、储藏、加工和运输过程中持续为害，严重威胁粮饲安全。因此，了解拟轮枝镰孢菌侵染玉米的过程对玉米茎、穗腐病的防控具有重要意义。

绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 和红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP) 是最常见的标记蛋白，RFP 变种 mCherry 是一种作为示踪剂的红色荧光染料，它们均具有稳定、使用方便、无物种专一性、易于在活细胞中观察等优点。荧光蛋白标记技术已经广泛应用于生命科学研究的各个领域，如研究蛋白的定位及时空示踪、基因表达、微生物与寄主的相互作用等过程^[5-7]。目前，荧光蛋白标记已经应用于研究尖孢镰孢菌 (*F. oxysporum*)^[8]、禾谷镰孢菌 (*F. graminearum*)^[9]、稻瘟菌 (*Magnaporthe oryzae*)^[10]、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)^[11] 等病原菌的侵染过程和有

性生殖等，但鲜有关于拟轮枝镰孢菌的研究。拟轮枝镰孢菌是异宗配合子囊菌，只有在 2 种不同交配型 (*MAT-1* 和 *MAT-2*) 的菌株间才可以进行有性生殖^[12-13]。因此，本研究通过聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 介导的原生质体转化法分别将 *eGFP* 和 *mCherry* 荧光蛋白基因导入到不同交配型的拟轮枝镰孢菌菌株 FvLNF15-11 和 FvSHF19-37 中，以期为研究拟轮枝镰孢菌的侵染过程、有性生殖和致病机制提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料、试剂和仪器

1.1.1 供试材料

供试植物材料为对拟轮枝镰孢菌引起的玉米茎、穗腐病表现感病的玉米自交系 B73 植株，种子由中国农业科学院作物科学研究所惠赠。供试拟轮枝镰孢菌菌株 FvLNF15-11 和 FvSHF19-37 分别分离自辽宁和上海采集的玉米病样；供试质粒包括 pMD18T-TrpCP、pMD18T-TrpCT、pMD18T-eGFP、pMD18T-mCherry 和 pCOM；菌株和质粒均由农业农村部农产品质量安全收贮运管控重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂

PCR 高保真 DNA 聚合酶 (P520-01)、胶回收试剂盒 (DC301-01)、质粒小提试剂盒 (DC201-01) 和无缝克隆试剂盒 (C113) 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。供试溶菌肉汤培养基 (luria-bertani medium, LB)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar medium, PDA)、酵母浸出粉胨葡萄糖培养基 (yeast extract peptone dextrose medium, YEPD)、完全培养基 (complete me-

dium, CM) 和胡萝卜琼脂培养基 (carrot agar medium, CA) 为微生物常用培养基, 再生液体培养基 (regeneration liquid medium, RLM) 和再生琼脂培养基 (regeneration agar medium, RAM) 的配制参考 RIDENOUR 等^[14]的方法。试验所用引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.1.3 主要仪器

艾本德台式高速离心机 (Eppendorf 5810 R); 伯乐 PCR 仪 (C1000); 北京六一琼脂糖水平电泳仪 (DYCP-31DN); 上海勤翔凝胶成像分析系统 (GeneSons 2000); 奥林巴斯光学显微镜 (CX23); 激光共聚焦显微镜 (蔡司 LSM 880)。

1.2 试验方法

1.2.1 拟轮枝镰孢菌交配类型鉴定

采用十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyltrimethyl ammonium bromide, CTAB) 法提取菌株基因组^[15], 使用 *MAT-1* 基因座和 *MAT-2* 基因座特异性引物 (表 1) 进行 PCR 扩增以确定拟轮枝镰孢菌 FvLNF15-11 和 FvSHF19-37 的交配型^[16]。

1.2.2 重组质粒的构建和酶切

以质粒 pMD18T-TrpCP 和 pMD18T-TrpCT 为模板, 通过引物 TrpCPF/TrpCPR 和 TrpCTF/Trp-

CTR (表 1) 分别扩增构巢曲霉 (*A. nidulans*) *trpC* 基因启动子 TrpCP 和终止子 TrpCT 序列片段, 利用无缝克隆的方法^[17]将上述片段构建到质粒 pCOM 中得到载体 pCOM-TrpCP-TrpCT。以质粒 pMD18T-eGFP 和 pMD18T-mCherry 为模板, 通过引物 TeGFPF/TeGFPR 和 TmCherryF/TmCherryR (表 1) 分别扩增 *eGFP* 和 *mCherry* 基因片段, 利用无缝克隆的方法^[17]将上述片段构建到 pCOM-TrpCP-TrpCT 载体, 得到质粒 pCOM-eGFP 和 pCOM-mCherry, 以 G418 抗生素作为筛选标记。用限制性内切酶 Hind III 对质粒 pCOM-eGFP 和 pCOM-mCherry 进行酶切, 使其线性化。

1.2.3 PEG 介导的拟轮枝镰孢菌原生质体转化

将从 PDA 平板上收集到的拟轮枝镰孢菌分生孢子接种于 YEPD 培养基中, 摇培过夜使孢子萌发为幼殖体。2 500 r/min 离心 5 min 收集幼殖体, 用 20 mL 0.7 mol/L NaCl 重悬和清洗幼殖体 2 次, 2 500 r/min 离心 5 min 后弃上清; 用 10 mL 0.7 mol/L NaCl 重悬幼殖体, 加入酶解液 (0.1 g 溶壁酶和 0.1 g 崩溃酶溶解于 10 mL 0.7 mol/L NaCl 中) 10 mL, 于 28 ℃、150 r/min 条件下酶解 3 h, 然后在 4 ℃、2 500 r/min 条件下离心 5 min 收集

表 1 本研究所使用的引物

Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物 primers	序列 (5'→3') sequences	用途 purpose
Gfmat1a	GTTCATCAAAGGGCAAGCG	检测交配类型 <i>MAT-1</i> to identify the mating type of <i>MAT-1</i>
Gfmat1b	TAAGCGCCCTCTTAACGCCTTC	
Gfmat2c	AGCGTCATTATTCGATCAAG	检测交配类型 <i>MAT-2</i> to identify the mating type of <i>MAT-2</i>
Gfmat2d	CTACGTTGAGAGCTGTACAG	
TrpCPF	CACCAGCCCCTGGGTGAATTCGACGTTAACTGATATTGAAGGA	构巢曲霉 <i>trpC</i> 启动子 TrpCP 片段扩增 to amplify TrpCP fragment from <i>trpC</i> promoter of <i>Aspergillus nidulans</i>
TrpCPR	AGGATCCCCGGGTACCGAGCTCAATCGATGCTTGGGTAGAATAG	
TrpCTF	CGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGATCCACTTAACGTTACTGAAA	构巢曲霉 <i>trpC</i> 终止子 TrpCT 片段扩增 to amplify TrpCT fragment from <i>trpC</i> terminator of <i>A. nidulans</i>
TrpCTR	AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTAACCCAGGGGCTGGTGACGGAA	
TeGFPF	CGGTACCCGGGGATCCTCTAGAATGATGAGCAAGGGCGAGGAGC	<i>eGFP</i> 基因片段扩增 to amplify <i>eGFP</i> gene fragment
TeGFPR	TTTCAGTAACGTAAAGTGATCCTATCGCGACTTGTACAGCTCG	
TmCherryF	CGGTACCCGGGGATCCTCTAGAATGGTCAGCAAGGGAGAGGAAG	<i>mCherry</i> 基因片段扩增 to amplify <i>mCherry</i> gene fragment
TmCherryR	TTTCAGTAACGTAAAGTGATCCTATTGTATAATTTCGTCCATT	
eGFPF	GGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCT	转化子中 <i>eGFP</i> 基因片段扩增 to amplify <i>eGFP</i> gene fragment from transformants
eGFPR	CGGCGGTACGAACTCCAGCAGGA	
mCherryF	ATGGTCAGCAAGGGAGAGGAAG	转化子中 <i>mCherry</i> 基因片段扩增 to amplify <i>mCherry</i> gene fragment from transformants
mCherryR	CTATTTGTATAATTCGTCCATT	
neoF	ATGATTGAACAAGATGGATTGC	转化子中 <i>neo</i> 基因片段扩增 to amplify <i>neo</i> gene fragment from transformants
neoR	TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGG	

原生质体；经预冷的 0.7 mol/L NaCl 溶液重悬和清洗后，再用预冷的 0.7 mol/L NaCl 溶液 500 μ L 重悬原生质体。取 HindⅢ 线性化的质粒 pCOM-eGFP 和 pCOM-mCherry 10 μ L 分别加入 100 μ L FvLNF15-11 和 FvSHF19-37 的原生质体中，冰上静置 30 min 后加入 40% PEG 溶液 100 μ L，室温放置 20 min；加入 RLM 培养基 800 μ L，在 25 $^{\circ}$ C、100 r/min 摇床中摇培过夜。将复壁后的溶液加到含有 100 μ g/mL G418 抗生素的 RAM 培养基 50 mL 中，混匀后倒板，在 25 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 2~4 d 后进行转化子筛选鉴定^[14]。

1.2.4 转化子的验证及遗传稳定性

以转化子的基因组为模板，用 *eGFP* 基因、*mCherry* 基因和抗性基因 *neo* 的特异性引物 (表 1) 进行 PCR 扩增以验证转化子，利用激光共聚焦显微镜对 PCR 验证到的阳性转化子进行荧光检测；观察到荧光的转化子在无 G418 抗生素的 PDA 培养基上继代培养 5 代，再转接到含有 G418 抗生素的 PDA 培养基上，观察菌株能否正常生长，以确认 *eGFP* 基因和 *mCherry* 基因在转化子中的遗传稳定性。

1.2.5 荧光标记菌株生长特性的观察

(1) 菌落形态观察及生长速率测定

GFP 标记菌株 FvLNF15-11-eGFP、mCherry 标记菌株 FvSHF19-37-mCherry 和相应的野生型菌株分别在 PDA 培养基活化 5 d，用直径为 1 cm 的吸头打边缘菌饼并转接到新的 PDA 培养基上；在 25 $^{\circ}$ C 培养箱黑暗培养 6 d 后，在 2 个垂直方向上测量菌落直径并拍照，每个处理重复 3 次^[18]。

(2) 产孢量统计和孢子形态观察

用直径为 1 cm 的吸头打 1 个边缘菌落至 1 mL ddH₂O 中，旋涡振荡 2 min，用血球计数板统计孢子数量并观察孢子形态，每个处理统计 3 次^[18]。

1.2.6 荧光标记菌株的致病性测定

(1) 孢子悬浮液的制备

将待测菌株接种于 CM 液体培养基中，于 25 $^{\circ}$ C、150 r/min 条件下摇培 3 d，使用灭菌的 3 层擦镜纸过滤菌液，收集分生孢子，用血球计数板计数并调节孢子悬浮液密度为 1×10^6 mL⁻¹^[18]。

(2) 玉米茎秆的接种

玉米自交系 B73 种子消毒后种植于温室，待玉米长到 10 叶期时，挑选长势一致的玉米进行接种。用灭菌牙签在玉米第 2、3 茎秆中间扎孔，

用注射器接种孢子悬浮液，再用灭菌纱布包裹接种处，期间用 ddH₂O 保湿 2 次；接种 7 d 后，沿接种处纵向劈开玉米茎秆并拍照，利用 ImageJ 统计病斑面积。以接种 ddH₂O 作为阴性对照，每个处理重复 3 次^[18]。

1.2.7 荧光标记菌株间的杂交及子囊壳产生情况

将菌株 FvLNF15-11 和 FvLNF15-11-eGFP 作为母本培养于 CA 培养基，菌株 SHF19-37 和 SHF19-37-mCherry 作为父本培养于 CM 固体培养基，于 25 $^{\circ}$ C 条件下培养 7 d 后，用 2.5% 吐温 60 冲洗父本菌株菌落并收集分生孢子，用血球计数板计数并调节孢子悬浮液密度为 1×10^8 mL⁻¹。吸取父本孢子悬浮液 1 mL 均匀涂布于母本菌株表面制成杂交平板，再将平板置于 25 $^{\circ}$ C、黑光灯条件下进行光照 12 h/黑暗 12 h 的循环诱导^[13, 19]，培养 4 周后观察子囊壳的产生情况。以 FvLNF15-11 与 FvSHF19-37 菌株的杂交结果作为对照，每个处理重复 3 次。

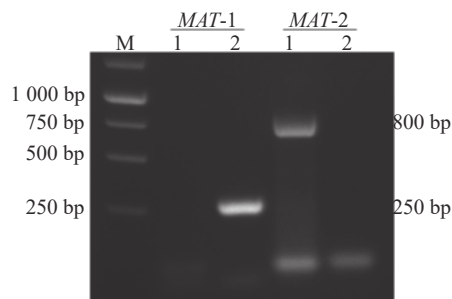
2 结果与分析

2.1 拟轮枝镰孢菌的交配类型

由图 1 可知：使用 *MAT-1* 基因座和 *MAT-2* 基因座特异性引物从菌株 FvLNF15-11 和 FvSHF19-37 的基因组中分别扩增出 800 和 250 bp 的片段，表明菌株 FvLNF15-11 为 *MAT-2* 型，菌株 FvSHF19-37 为 *MAT-1* 型。

2.2 质粒的构建及转化子的筛选与鉴定

利用无缝克隆的方法成功构建了 pCOM-eGFP 和 pCOM-mCherry 载体 (图 2a)。通过 PEG 介导



注：M. 1 kb DNA Marker，下同；1. 菌株 FvLNF15-11；2. 菌株 FvSHF19-37。

Note: M. 1 kb DNA Marker, the same as below; 1. strain FvLNF15-11; 2. strain FvSHF19-37.

图 1 野生型菌株 FvLNF15-11 和 FvSHF19-37 的交配类型

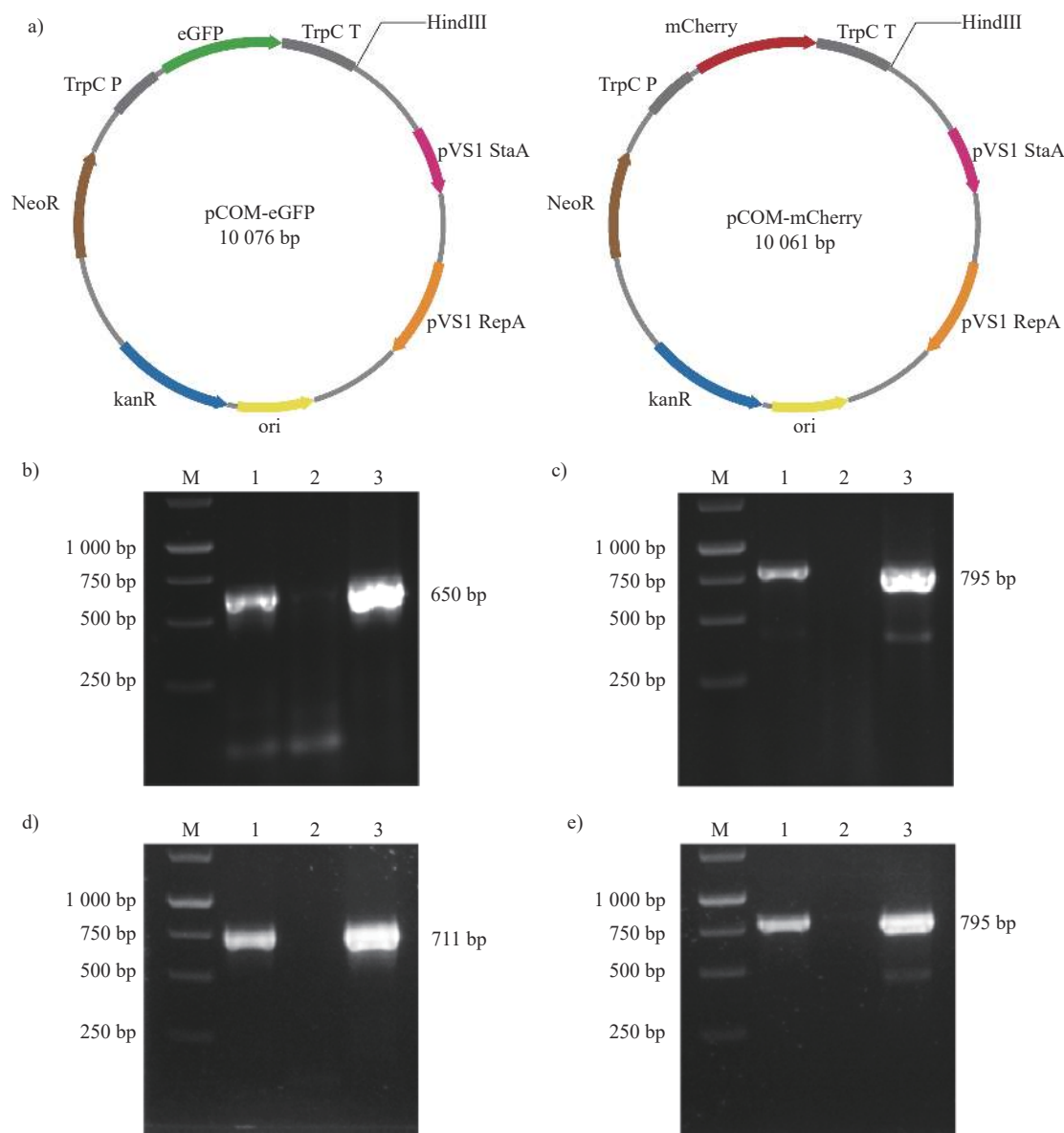
Fig. 1 Mating types of the wild-type strains FvLNF15-11 and FvSHF19-37

的原生质体遗传转化后, 利用 *eGFP* 基因和 *neo* 基因特异性引物从 FvLNF15-11-eGFP 转化子中分别扩增出 650 和 795 bp 的片段 (图 2b~c); 利用 *mCherry* 基因和 *neo* 基因特异性引物从 FvSHF19-37-mCherry 转化子中分别扩增出 711 和 795 bp 的片段 (图 2d~e)。PCR 扩增的片段大小与预期一致, 表明 *eGFP* 基因和 *mCherry* 基因已分别整合到 F-

vLNF15-11 和 FvSHF19-37 菌株的基因组中。

2.3 荧光标记菌株的荧光观察及遗传稳定性

荧光检测结果 (图 3) 显示: 菌株 FvLNF15-11-eGFP 的分生孢子和菌丝中观察到绿色荧光, 菌株 FvSHF19-37-mCherry 的分生孢子和菌丝中观察到红色荧光, 而野生型菌株中未观察到荧光, 表明 *eGFP* 基因和 *mCherry* 基因在相应的菌

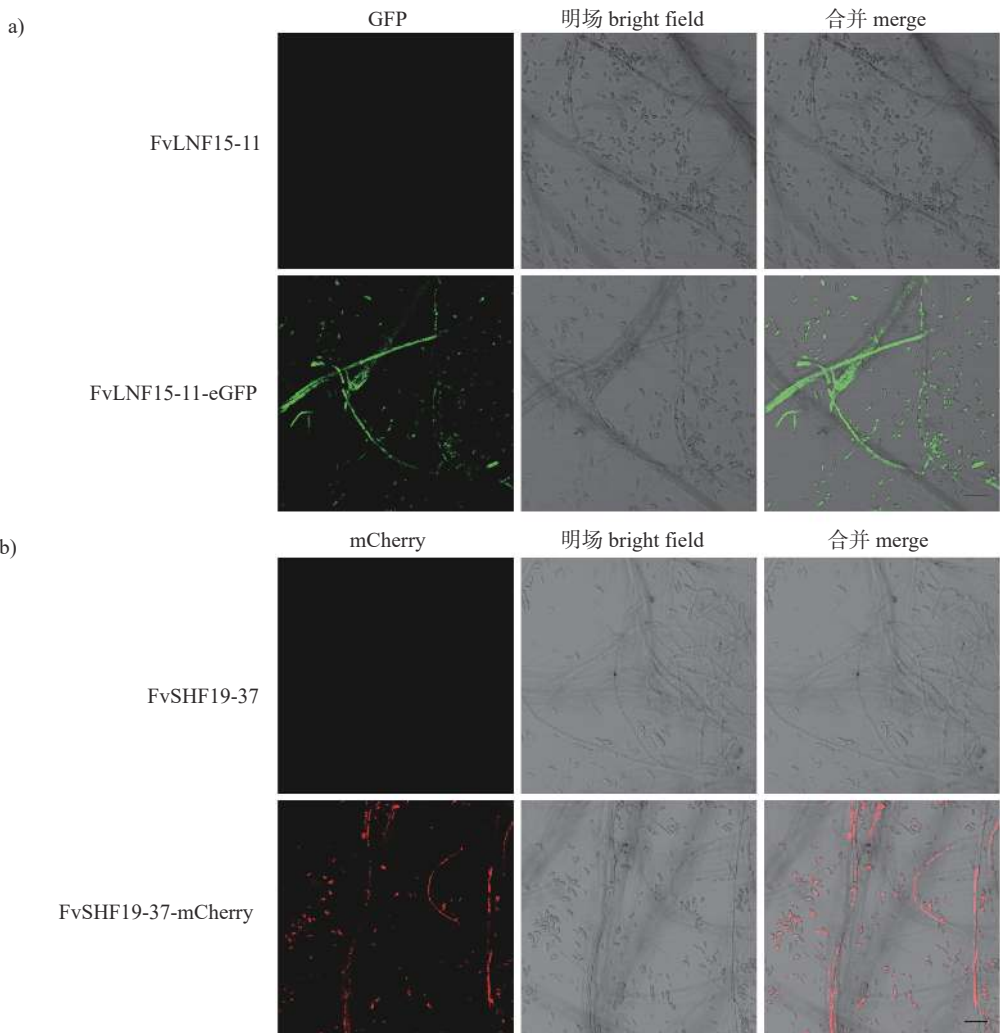


注: a) 携带 *eGFP* 和 *mCherry* 基因的质粒图谱。b) 和 c) 转化子 FvLNF15-11-eGFP 中 *eGFP* 基因 (b) 和 *neo* 基因 (c) 的 PCR 检测: 1. 转化子 FvLNF15-11-eGFP; 2. 野生型 FvLNF15-11; 3. pCOM-eGFP 质粒。d) 和 e) 转化子 FvSHF19-37-mCherry 中 *mCherry* 基因 (d) 和 *neo* 基因 (e) 的 PCR 检测: 1. 转化子 FvSHF19-37-mCherry; 2. 野生型 FvSHF19-37; 3. pCOM-mCherry 质粒。

Note: a) plasmid maps of carrying gene *eGFP* and *mCherry*. b) and c) PCR identification of *eGFP* (b) and *neo* (c) gene in transformant FvLNF15-11-eGFP: 1. transformant FvLNF15-11-eGFP; 2. wild type stain FvLNF15-11; 3. plasmid pCOM-eGFP. d) and e) PCR identification of *mCherry* (d) and *neo* (e) gene in transformant FvSHF19-37-mCherry: 1. transformant FvSHF19-37-mCherry; 2. wild type stain FvSHF19-37; 3. plasmid pCOM-mCherry.

图 2 质粒图谱及荧光标记转化子 PCR 鉴定的电泳图

Fig. 2 Plasmid map and electrophoresis image for PCR identification of fluorescently labeled transformants



注：a) 菌株 FvLNF15-11-eGFP 的菌丝和孢子中有绿色荧光蛋白表达，野生型菌株 FvLNF15-11 为对照；b) 菌株 FvSHF19-37-mCherry 的菌丝和孢子中有红色荧光蛋白表达，野生型菌株 FvSHF19-37 为对照；标尺=20 μm。

Note: a) the expression of green fluorescent protein in the mycelia and conidia of the strain FvLNF15-11-eGFP, the wild type strain FvLNF15-11 was used as a control; b) the expression of red fluorescent protein in the mycelia and conidia of strain FvSHF19-37-mCherry, the wild type strain FvSHF19-37 was used as a control; scale bar=20 μm.

图 3 荧光标记在拟轮枝镰孢菌菌丝和分生孢子中的荧光表达

Fig. 3 Fluorescence expression of mycelia and conidia in fluorescently labeled *Fusarium verticillioides*

株中成功表达。荧光标记菌株继代培养 5 代后转接到含 G418 抗生素的 PDA 平板上继续培养，菌株能正常生长，表明 *eGFP* 基因和 *mCherry* 基因能够稳定遗传。

2.4 荧光标记菌株的生长特性

由图 4 可知：荧光标记菌株的菌落形态、孢子形态、生长速率和产孢量与野生型菌株无明显差异，表明 *eGFP* 基因和 *mCherry* 基因的插入不影响荧光标记菌株 FvLNF15-11-eGFP 和 FvSHF19-37-mCherry 的生长发育。

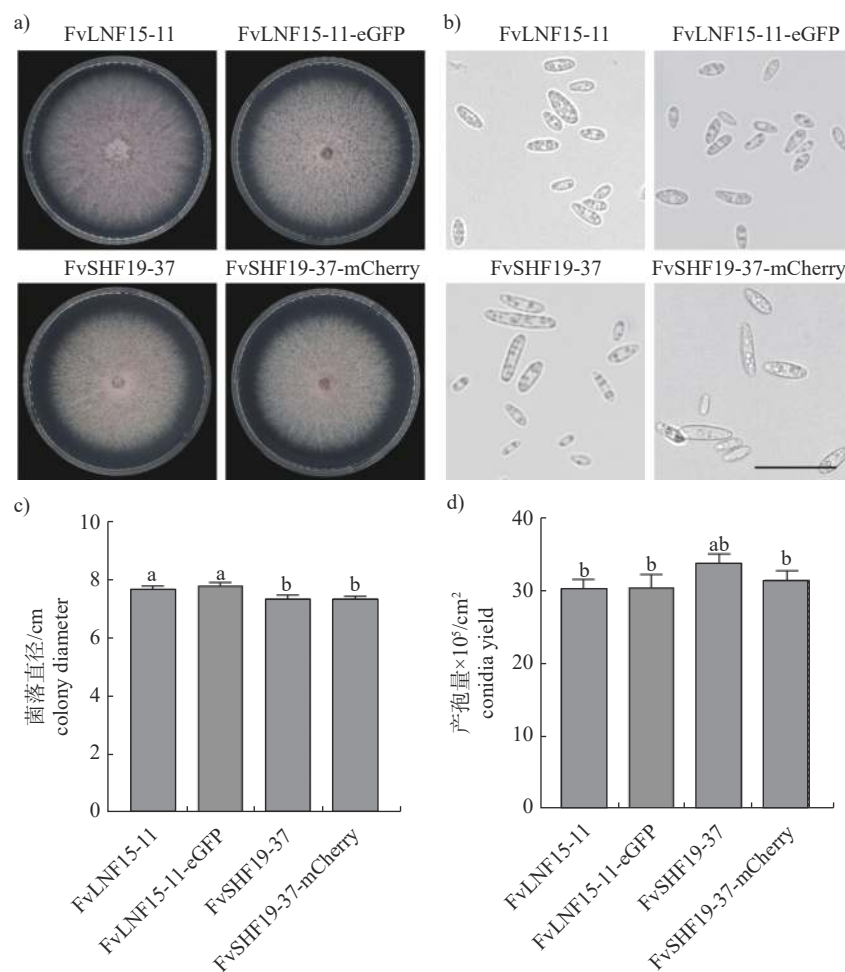
2.5 荧光标记菌株的致病性

荧光标记菌株和野生型菌株接种玉米茎秆

后，玉米茎秆组织均出现褐色病斑及腐烂，而接种无菌水的对照未观察到症状(图 5a)；荧光标记菌株的病斑面积与野生型菌株的病斑面积差异不显著(图 5b)，表明荧光标记菌株能侵染玉米并造成玉米茎腐病，且致病力与野生型菌株相似。

2.6 荧光标记菌株的有性生殖能力

由图 6 可知：通过黑光灯诱导后，荧光标记菌株产生的子囊壳数量与野生型菌株相近，表明 *eGFP* 基因和 *mCherry* 基因不影响标记菌株 FvLNF15-11-eGFP 和 FvSHF19-37-mCherry 的有性生殖能力。

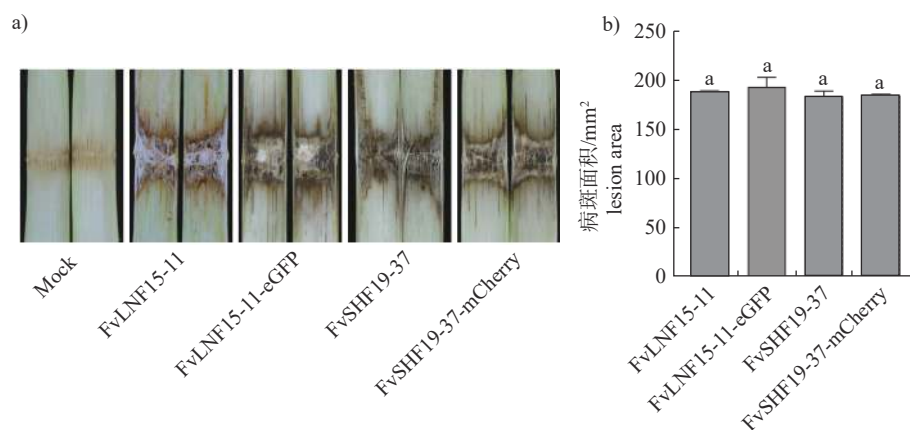


注: a) 菌落形态; b) 孢子形态, 标尺=20 μm ; c) 和 d) 中, 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 下同。

Note: a) colony morphology; b) conidia morphology, scale bar=20 μm ; different letters in figure c) and d) indicate significant differences ($P<0.05$), the same as below.

图 4 荧光标记拟轮枝镰孢菌的生长特性

Fig. 4 Growth characteristics of fluorescently labeled *F. verticillioides*



注: a) 野生型菌株和荧光标记菌株侵染玉米茎秆后的症状, Mock 为接种无菌水的阴性对照。

Note: a) symptoms of maize stalks infected by wildtype strain and fluorescently labeled strain, Mock indicates a negative control inoculates with sterile water served.

图 5 荧光标记拟轮枝镰孢菌的致病性

Fig. 5 Pathogenicity of fluorescently labeled *F. verticillioides*

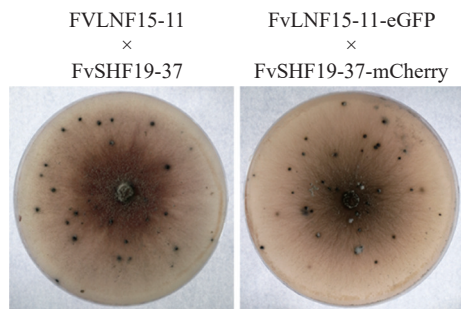


图 6 荧光标记拟轮枝镰孢菌的有性生殖能力
Fig. 6 Sexual reproduction ability of fluorescently labeled *F. verticillioides*

3 讨论

荧光标记技术被广泛运用于研究病原菌的侵染过程、致病机制等^[5-7], 本研究通过 PEG 介导的遗传转化方法成功构建了不同交配型拟轮枝镰孢菌的荧光标记菌株 FvLNF15-11-eGFP 和 FvSHF19-37-mCherry, *eGFP* 和 *mCherry* 基因在相应菌株的菌丝和孢子中能稳定表达。在真菌的遗传转化中, 外源基因随机整合到基因组中可能会影响真菌的生长发育^[20], 但本研究中荧光标记菌株的菌落形态和孢子形态与野生型菌株十分相似, 且两者的生长速率和产孢量无明显差异, 表明 *eGFP* 基因和 *mCherry* 基因不影响荧光标记菌株 FvLNF15-11-eGFP 和 FvSHF19-37-mCherry 的生长发育, 这与 WU 等^[21]的研究结果相似。由于镰孢菌通过有性生殖产生子囊孢子越冬完成病害循环^[22], 本研究对荧光标记菌株的有性生殖进行测定, 结果显示荧光标记菌株产生的子囊壳数量与野生型菌株相近, 表明 *eGFP* 基因和 *mCherry* 基因不影响荧光标记菌株 FvLNF15-11-eGFP 和 FvSHF19-37-mCherry 的有性生殖能力, 这一结果与 LUIS 等^[11]的研究报道一致。本研究表明: 接种拟轮枝镰孢菌后, 玉米茎秆组织出现褐色病斑及腐烂的发病症状, 且荧光标记菌株与野生型菌株的病斑面积差异并不显著, 表明荧光标记菌株保持了与野生型菌株相似的致病力; GAI 等^[23]研究显示: *eGFP* 标记的拟轮枝镰孢菌与野生型菌株对玉米病害病情指数的影响无明显差异, 但 *eGFP* 标记拟轮枝镰孢菌的毒力明显弱于野生型菌株, 这可能是由于 *eGFP* 基因随机整合到基因组中影响某些功能基因的表达。因此, 本研究构建的荧光标记菌株 FvLNF15-11-eGFP 和 FvSHF19-

37-mCherry 可以更好地用于研究拟轮枝镰孢的侵染和有性生殖等过程。

4 结论

本研究通过 PEG 介导的原生质体转化法成功将荧光蛋白基因 *eGFP* 和 *mCherry* 分别导入到不同交配型的拟轮枝镰孢菌中, 获得带有荧光标记的 FvLNF15-11-eGFP 和 FvSHF19-37-mCherry 菌株。该荧光标记不会影响拟轮枝镰孢菌的生长发育、有性生殖以及致病力。研究结果为后续拟轮枝镰孢菌的侵染过程、有性生殖和致病机制研究提供了材料。

[参考文献]

- [1] 段灿星, 曹言勇, 董怀玉, 等. 玉米种质资源抗腐霉茎腐病和镰孢茎腐病精准鉴定[J]. 中国农业科学, 2022, 55(2): 265. DOI: [10.3864/j.issn.0578-1752.2022.02.003](https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2022.02.003).
- [2] DASTJERDI R, KARLOVSKY P. Systemic infection of maize, sorghum, rice, and beet seedlings with fumonisin-producing and nonproducing *Fusarium verticillioides* strains[J]. The Plant Pathology Journal, 2015, 31(4): 334. DOI: [10.5423/PPJ.OA.05.2015.0088](https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.05.2015.0088).
- [3] MORALES L, MARINO T P, WENNDT A J, et al. Dissecting symptomatology and fumonisin contamination produced by *Fusarium verticillioides* in maize ears[J]. Phytopathology, 2018, 108(12): 1475. DOI: [10.1094/PHYTO-05-18-0167-R](https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-18-0167-R).
- [4] DUNCAN K E, HOWARD R J. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009, 23(1): 6. DOI: [10.1094/MPMI-23-1-0006](https://doi.org/10.1094/MPMI-23-1-0006).
- [5] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263(5148): 802. DOI: [10.1126/science.8303295](https://doi.org/10.1126/science.8303295).
- [6] CHAPAGAIN P P, REGMI C K, CASTILLO W. Fluorescent protein barrel fluctuations and oxygen diffusion pathways in mCherry[J]. The Journal of Chemical Physics, 2011, 135(23): 235101. DOI: [10.1063/1.3660197](https://doi.org/10.1063/1.3660197).
- [7] RANSOME M, ELLERMEIER C D, WEISS D S. Use of mCherry red fluorescent protein for studies of protein localization and gene expression in *Clostridium difficile*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(5): 1652. DOI: [10.1128/AEM.03446-14](https://doi.org/10.1128/AEM.03446-14).
- [8] YAO J N, HUANG P, CHEN H X, et al. *Fusarium oxysporum* is the pathogen responsible for stem rot of the succulent plant *Echeveria* 'Perle von Nürnberg' and observation of the infection process[J]. European Journal of Plant Pathology, 2021, 159(3): 555. DOI: [10.1007/s10658-020-02186-4](https://doi.org/10.1007/s10658-020-02186-4).
- [9] QIU H, ZHAO X, FANG W Q, et al. Spatiotemporal nature of *Fusarium graminearum*-wheat coleoptile inter-

- actions[J]. *Phytopathology Research*, 2019, 1(1): 26. DOI: [10.1186/s42483-019-0033-7](https://doi.org/10.1186/s42483-019-0033-7).
- [10] 郭晓宇, 李玲, 董波, 等. 利用荧光蛋白标记研究稻瘟病菌有性世代的细胞结构[J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(7): 1138. DOI: [10.11844/cjcb.2018.07.0079](https://doi.org/10.11844/cjcb.2018.07.0079).
- [11] LUIS J M, CARBONE I, PAYNE G A, et al. Characterization of morphological changes within stromata during sexual reproduction in *Aspergillus flavus*[J]. *Mycologia*, 2020, 112(5): 908. DOI: [10.1080/00275514.2020.1800361](https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1800361).
- [12] LESLIE J F, KLEIN K K. Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi[J]. *Genetics*, 1996, 144(2): 557. DOI: [10.1093/genetics/144.2.557](https://doi.org/10.1093/genetics/144.2.557).
- [13] KLITTICH C, LESLIE J F. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*)[J]. *Genetics*, 1988, 118(3): 417. DOI: [10.1093/genetics/118.3.417](https://doi.org/10.1093/genetics/118.3.417).
- [14] RIDENOUR J B, HIRSCH R L, BLUHM B H. Identifying genes in *Fusarium verticillioides* through forward and reverse genetics[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 835: 457. DOI: [10.1007/978-1-61779-501-5_28](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5_28).
- [15] KERÉNYI Z, ZELLER K, HORNOK L, et al. Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 4071. DOI: [10.1128/aem.65.9.4071-4076.1999](https://doi.org/10.1128/aem.65.9.4071-4076.1999).
- [16] STEENKAMP E T, WINGFIELD B D, COUTINHO T A, et al. PCR-based identification of *MAT-1* and *MAT-2* in the *Gibberella fujikuroi* species complex[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4378. DOI: [10.1128/AEM.66.10.4378-4382.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4378-4382.2000).
- [17] 蔡松, 唐梅, 杨东成, 等. 无缝克隆技术的研究进展[J]. *生物加工过程*, 2023, 21(2): 144. DOI: [10.3969/j.issn.1672-3678.2023.02.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-3678.2023.02.003).
- [18] RIDENOUR J B, BLUHM B H. The HAP complex in *Fusarium verticillioides* is a key regulator of growth, morphogenesis, secondary metabolism, and pathogenesis[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2014, 69: 52. DOI: [10.1016/j.fgb.2014.05.003](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.05.003).
- [19] GUO L, BLATT A Z, GEISER D M, et al. Mating type and spore killing characterization of *Fusarium verticillioides* strains[J]. *Mycological Progress*, 2015, 14(4): 16. DOI: [10.1007/s11557-015-1045-z](https://doi.org/10.1007/s11557-015-1045-z).
- [20] 王越, 李雅凝, 曲晓磊, 等. 丝状真菌遗传转化体系及筛选技术的研究进展[J]. *中国林副特产*, 2020(6): 69. DOI: [10.13268/j.cnki.fbsic.2020.06.028](https://doi.org/10.13268/j.cnki.fbsic.2020.06.028).
- [21] WU L, CONNER R L, WANG X M, et al. Variation in growth, colonization of maize, and metabolic parameters of GFP- and DsRed-labeled *Fusarium verticillioides* strains[J]. *Phytopathology*, 2016, 106(8): 890. DOI: [10.1094/PHYTO-09-15-0236-R](https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-15-0236-R).
- [22] KIM H K, JO S M, KIM G Y, et al. A large-scale functional analysis of putative target genes of mating-type loci provides insight into the regulation of sexual development of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(9): e1005486. DOI: [10.1371/journal.pgen.1005486](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005486).
- [23] GAI X T, DONG H Y, WANG S, et al. Infection cycle of maize stalk rot and ear rot caused by *Fusarium verticillioides*[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0201588. DOI: [10.1371/journal.pone.0201588](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201588).

责任编辑: 何馨成