

原生质体法介导真菌遗传转化的研究进展

沈慧敏, 李超, 高利*, 刘太国, 刘博, 陈万权

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 原生质体法介导真菌遗传转化体系是实现大规模随机、定点突变和菌种改良的方法之一, 为研究真菌致病性和侵染机制奠定了基础。原生质体法构建转化体系的步骤包括原生质体的制备、转化与再生, 其中关键是原生质体的制备, 通常采用酶解法破除细胞壁获得原生质体, 其获得率直接影响转化效率。转化通常借助于聚乙二醇(PEG)介导、电击或限制性内切酶法完成, 其中 PEG 介导的原生质体转化法较传统, 技术较成熟; 电击法操作较简单; 限制性内切酶(REMI)介导的整合转化, 因其转化效率较高, 可产生大量稳定的转化子, 正被越来越多地应用于丝状真菌的遗传转化。

关键词 原生质体; 制备与再生; PEG 介导; 电击; REMI; 转化子

中图分类号: Q 78 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.004

Research progress in transformation of fungi mediated by protoplasts

Shen Huimin, Li Chao, Gao Li, Liu Taiguo, Liu Bo, Chen Wanquan

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insects Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract The use of protoplast-mediated genetic transformation system is one of the means to achieve large-scale randomized and site-specific mutagenesis as well as strain improvement in fungi. It lays a foundation for studying fungal pathogenicity and infection mechanism. The procedure of constructing a protoplast-mediated transformation system involves protoplast preparation, transformation and regeneration. Among them, protoplast preparation is the key step, which is usually obtained by enzyme digestion-based cell wall removal. Protoplast production rate directly affects transformation efficiency. Transformation is usually mediated by polyethylene glycol (PEG), electric shock or restriction endonuclease digestion; PEG-mediated protoplast transformation is a relatively traditional and mature technique. The electric shock method is featured by simple operation. Because of the higher transformation efficiency which can produce a large number of stable transformants, restriction enzyme mediated integration (REMI) method is increasingly used in the genetic transformation of filamentous fungi.

Key words protoplast; preparation and regeneration; PEG-mediated; electrical stimulation; REMI; transformant

随着真菌分子生物学的迅速发展,越来越多的真菌全基因组序列测序成功,真菌生物学研究进入了功能基因组学时代,对能够实现大规模随机和定点突变技术的需求日益增加。遗传转化技术是实现大规模随机和定点突变的重要方法之一,利用该技术可改变真菌的遗传物质,可为深入研究真菌的某些代谢及生理现象提供方法,还可致力于解析真菌的致病机理。目前,实现真菌遗传转化的方法

很多,如针对原生质体的遗传转化方法有聚乙二醇(PEG)介导的转化、电击转化和限制性内切酶(REMI)介导的基因整合;针对完整细胞的遗传转化有以根癌农杆菌 Ti 质粒为载体的转化法、醋酸锂转化及基因枪法等。不同的转化方法针对的对象不同,转化效率也不同。

原生质体转化法以萌发的孢子、芽管或新生菌丝制备原生质体,经 Ca^{2+} 处理使之成为容易吸收外

收稿日期: 2016-03-23 修订日期: 2016-07-11

基金项目: 国家自然科学基金(31571965);北京市自然科学基金(6162022);北京市科技新星(Z131105000413057);北京市自然科学基金北京市科学技术研究院联合资助项目(L140012);小麦产业技术体系(CARS-03)

* 通信作者 E-mail: lgao@ippcaas.cn

界物质的感受态。构建携带外源基因和遗传选择标记的质粒,将制备好的原生质体悬浮于含质粒 DNA 的溶液中,在聚乙二醇、电击或限制性内切酶的作用下,外源 DNA 可被受体菌的原生质体吸收并整合到其基因组中,再生菌体即可表达外源基因赋予的新遗传性状。转化子因带有显性选择标记(如对抗生素的抗性和荧光标记),可通过选择性培养基进行选择 and 鉴定。原生质体的制备与再生是实现该方法的基础,也是关键步骤,其活性和再生率直接决定转化能否成功。以下是主要步骤的几个方面。

1 原生质体的制备与再生

该部分是进行转化的关键步骤,主要包括以下几个内容:

(1) 原始材料的准备

制备原生质体的材料一般为幼嫩菌丝、分生孢子或担孢子。菌体的生长时期、生长温度和培养时间均会影响原生质体的制备,应避免菌体培养时间过长或过短,影响原生质体的制备和再生。为了制备出较多的原生质体,需要优化菌体的培养时间。如在 CM 液体完全培养基中培养芦笋茎枯病菌 *Phomopsis asparagi* 的分生孢子 3 d 后可获得较多的原生质体^[1],而培养 4 d 的黑曲霉 *Aspergillus niger* 幼嫩菌丝体更宜用来制备原生质体^[2]。

(2) 溶壁酶系统

真菌原生质体通常采用酶解法去除细胞壁。不同真菌的细胞壁组成不同,主要包括纤维素、半纤维素、几丁质、葡聚糖及蛋白质等。研究中应根据真菌细胞壁的组成特点,选择合适的细胞壁降解酶。常用的细胞壁降解酶有蜗牛酶、崩溃酶及溶壁酶等。蜗牛酶中含有纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、葡糖酸酶、几丁质酶和脂酶等 30 多种酶,在 pH 5.8~7.0 有较好的裂解真菌细胞壁的作用,是制备真菌原生质体有效的工具酶之一,尤其适合于降解含葡聚糖较多的真菌,如红色酵母 *Phaffia rhodozyma* 的细胞壁^[3]。崩溃酶是一类含有昆布多糖酶、木聚糖酶及纤维素酶的复合酶,广泛应用于多种植物病原真菌的原生质体制备,该裂解酶尤其适合疫霉 *Phytophthora* 的细胞壁裂解^[4]。此外来自哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* 的溶壁酶具有蛋白酶、几丁质酶及纤维素酶等活性,在子囊菌如禾顶囊壳 *Gaeumannomyces graminis* 的原生质体制备中效果

较好^[5]。稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* 产生原生质体效率最高的酶是裂解酶和崩溃酶,且当酶浓度为 10 mg/mL 时产生的原生质体数量最多,酶解 2~3 h 后即可获得相当数量的原生质体,两种酶的最适作用温度分别为 30℃ 和 32℃^[6];适于裂解小麦纹枯病菌 *Rhizoctonia cerealis* 的崩溃酶,最佳反应温度是 24℃,最适的酶解时间为 3 h^[7];无论是真菌菌丝还是孢子,细胞壁的成分都比较复杂,所以在制备原生质体过程中通常选取上述酶中的 2~3 种混合使用,酶的浓度通常在 0.5%~5%,酶解时间一般在 2~4 h,酶解的最适温度为 28~32℃。通常在实际操作中要根据不同真菌细胞壁的成分而选择酶组合形式、酶解时间和酶解温度。

(3) 渗透压稳定剂

渗透压稳定剂主要起维持质膜系统渗透压的作用,降解细胞壁的酶类会破坏膜质系统使其难以再生,甚至破裂、失活。当刚刚形成的原生质体被释放到酶液中时,酶系统对原生质体会起到伤害作用,如果伤害过大,会直接影响原生质体的再生和转化,此时需要渗透压稳定剂来维持细胞质膜的渗透压,对原生质体起到保护作用^[8]。因此,渗透压稳定剂种类的选择至关重要。不同真菌细胞所需的渗透压稳定剂不同,如水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 较适渗透压稳定剂为 0.6 mol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ^[9];黑曲霉 *Aspergillus niger* 较适渗透压稳定剂为 1 mol/L 山梨醇^[2];小麦全蚀病菌 *Gaeumannomyces graminis* 和青霉 *Penicillium* 较适渗透压稳定剂为 0.6 mol/L NaCl^[10]。

(4) 再生培养基

原生质体的再生和原生质体的制备同等重要,需要探索和尝试合适的再生培养基,如 1.0 mol/L 甘露醇较适合水稻纹枯病菌 *R. solani* 原生质体的再生^[9];CM 培养基和 PDB 培养基较适合玉米丝轴黑粉菌 *Sphacelotheca reiliana* 原生质体的再生^[11];0.6 mol/L 蔗糖完全培养基较适合红曲霉 *Monascus anka* 原生质体的再生^[12]。

2 原生质体法构建遗传转化体系的原理以及已转化成功的真菌

采用原生质体构建遗传转化体系时通常借助于 PEG 介导、电击或限制性内切酶介导来完成。将制备好的原生质体悬浮后加入已构建好的质粒载体,

然后分别加入一定量的 PEG 缓冲液、限制性内切酶或者放入电极杯中进行电击,按照一定的操作步骤处理好后再加入到选择性再生培养基中,直到长出转化子。

2.1 PEG 介导的原生质体转化法

PEG 介导的遗传转化是使用较早较普遍的细胞融合方法。1978 年, Hinnen 等^[13]首先利用聚乙二醇作为介质成功完成了酵母原生质体转化,此后 PEG 介导的原生质体转化法逐渐应用于粗糙链孢菌 *Neurospora crassa* 和构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 等^[14]。一般认为 PEG 能和 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 等二价阳离子及外源 DNA 在细胞表面形成沉淀,从而改变质膜的通透性,以利于外源 DNA 的进入。高静等^[15]建立了 PEG 介导的苹果腐烂病菌 *Cytospora mandshurica* 原生质体遗传转化体系,为深入研究该病菌的致病相关基因奠定了基础。宁平等^[11]研究了 PEG 介导的玉米丝轴黑粉菌 *S. reiliana* 原生质体转化,其转化效率约 10 个转化子/ μg DNA,筛选出稳定表达潮霉素 B 抗性的转化菌株,继代培养 9 代后仍有潮霉素抗性。另外,现采用 PEG 介导的方法已建立了大麦坚黑粉菌 *Ustilago hordei*、红曲霉 *M. anka*、哈茨木霉 *T. harzianum*、尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 及玉米弯孢叶斑病菌 *Curvularia lunata* 等遗传转化体系^[16-19]。

2.2 电击转化法

电击转化法是传统 PEG 转化法的基础,其原理是利用直流短电脉冲在原生质体膜或细胞膜上形成可逆的瞬间通道,以利于外源 DNA 进入,质膜具有可修复性,外加电场造成的膜穿孔可在一定时间内自动修复^[20]。由于电击转化步骤简单,转化效率较高,目前已经应用于不同物种的完整细胞和原生质体,包括细菌^[21]和真菌^[22]。

2.3 限制性内切酶介导的原生质体转化法

在 PEG 和 Ca^{2+} 存在的情况下,限制性内切酶和 DNA 连接酶可进入原生质体中,在限制性内切酶的作用下,染色体 DNA 的相应位点被切开,接着在 DNA 连接酶的作用下外源 DNA 插入到目标基因组中,该技术应用于很多真菌致病相关基因的标记与克隆^[23]。Bölker 等^[24]用限制性内切酶法转化了玉蜀黍黑粉菌 *Ustilago maydis*,得到了约 1 000 个插入突变体; Sánchez 等^[25]通过 REMI 法转化了构巢曲霉 *Aspergillus nidulans*,并试图通过此方法

来标记参与真菌无性繁殖的新基因; Tanaka 等^[26]基于 REMI 法对链格孢菌 *Alternaria alternata* 进行了转化;王秋华等^[27]对尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 的 REMI 转化体系进行了优化,并对部分转化子的表型进行了初步分析;迟归兵等^[28]通过限制性内切酶介导稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* 原生质体转化,建立了突变体库。基于 REMI 法成功进行原生质体转化的真菌还有链格孢 *Alternaria alternata*、玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*、玉米小斑病菌 *Cochliobolus heterostrophus*、灰盖鬼伞菌 *Coprinus cinereus*、构巢曲霉 *Aspergillus nidulans*、稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea*、哈茨木霉 *T. harzianum*、红曲霉 *Monascus anka*、甘蓝枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、玉米弯孢叶斑病菌 *C. lunata*、葡萄溃疡病菌 *Lasiodiplodia theobromae* 等^[29-41]。

3 转化子筛选

将转化后的原生质体涂布在含有已筛选浓度的抗生素(常用的抗生素有潮霉素、腐草霉素、遗传霉素及新霉素等)再生培养基上,经 3~7 d 左右长出菌落,进行转化子的抗生素抗性鉴定^[11];将在含抗生素平板上长出来的菌落转接到新的抗生素平板上,等菌落长出后再以同样的方法继代培养 5 代以上,检测转化子的遗传稳定性;提取 DNA 用特定抗生素的引物 PCR 检测抗生素插入的片段^[20]。

4 展望

利用原生质体法构建遗传转化体系的关键是原生质体的制备与再生,一般采用新生菌丝或孢子来制备原生质体。影响真菌原生质体制备的因素有很多,如菌龄过长会使细胞壁不容易酶解,从而影响原生质体的释放。真菌的细胞壁组成较复杂,混合酶液比单一酶液酶解效果要好,在制备原生质体时要根据不同的真菌细胞壁成分来选择合适的酶以及酶液浓度。渗透压稳定剂在酶解时能够维持原生质体的渗透压稳定,防止酶破坏膜系统,使原生质体难以再生,所以渗透压稳定剂的种类和浓度的选择与酶的选择同样重要。酶解时间过短,不能充分制备数量较多的原生质体,酶解时间过长,会影响再生。选择合适的酶解温度,能使酶更好地发挥作用。综上所述,菌龄、酶系统、渗透压稳定剂、酶解时间及酶解温度等都会影响原生质体的数量和质量。转化时的

质粒中通常含有抗性标记和荧光标记。以抗性标记为选择系统时,受体真菌对抗生素的敏感性很重要,潮霉素对大多数真菌具有抑制作用,很多真菌在遗传转化中都选择将潮霉素抗性基因连接在载体上,因此可以考虑在研究其他真菌的转化时构建带潮霉素抗性基因的载体,再在含敏感浓度的潮霉素平板上进行筛选。

PEG 介导的原生质体转化法自从 1978 年第一次转化酵母成功后,近 40 年来,随着技术不断成熟,应用范围越来越广,已在玉米丝轴黑粉菌 *S. reiliana*^[11] 和红曲霉 *M. anka*^[36] 等真菌中实现了转化。电击转化操作较简便,既可以应用于原生质体也可用于完整细胞,不仅适用于丝状真菌还适用于细菌和哺乳动物。影响电击转化法的因素有电压和连接反应混合物的盐浓度等^[42]。REMI 法转化率较高,转化子较稳定^[37]。

原生质体的制备与再生是进行遗传转化的基础,但对于有些真菌来说,其原生质体制备过程繁杂,再生较难,转化效率较低,转化子不稳定,所以不适合进行原生质体转化,因此在选择转化方法时要先确定原生质体的制备和再生是否能够实现。在确定可以使用原生质体法转化后,进一步进行条件优化,提高转化效率,不同真菌原生质体的制备与再生的优化条件要进一步开展深入研究。

参考文献

- [1] 张岳平, 罗绍春, 黄燕萍, 等. 芦笋茎枯病菌原生质体的制备及再生[J]. 植物保护学报, 2014, 41(2): 182-186.
- [2] 姚婷婷, 王正祥. 黑曲霉原生质体的制备、再生及转化条件[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(4): 116-120.
- [3] 曲秋皓, 宁国赞. 红色酵母原生质体形成和再生条件的研究[J]. 工业微生物, 1998, 28(4): 38-41.
- [4] 陈孝仁, 王源超, 张正光, 等. 大豆疫霉菌原生质体制备及再生菌株的生物学性状[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(4): 45-49.
- [5] 张颖, 王刚, 王美男. 小麦全蚀病菌原生质体制备的条件及再生菌株的致病性[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(5): 29-32.
- [6] 周益军, 范永坚, 王金生, 等. 稻瘟病菌原生质体的制备和再生菌株的致病性[J]. 江苏农业学报, 2000, 16(2): 83-87.
- [7] 张颖, 李黎, 许玉斌, 等. 小麦纹枯病菌原生质体制备条件及再生菌株致病性研究[J]. 河南农业科学, 2014, 43(8): 82-85.
- [8] Jeanmougin F, Thompson J D, Gouy M, et al. MultiPle Sequence alignment with Clustal X[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1998, 23: 403-405.
- [9] 杨迎青, 李明海, 杨媚, 等. 水稻纹枯病菌原生质体制备与再生条件的优化[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 546-551.
- [10] 陈振明, 郭泽建, 林福呈, 等. 以潮霉素抗性为选择标记的毛壳霉原生质体转化[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2001, 27(1): 19-22.
- [11] 宁平. PEG 介导的玉米丝轴黑粉菌原生质体转化与 ras, gpd 启动子的克隆[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [12] 周礼红, 李国琴, 王正祥, 等. 红曲霉原生质体的制备、再生及其遗传转化系统[J]. 遗传, 2005, 27(3): 423-428.
- [13] Hinnen A, Hicks J B, Fink G R. Transformation of yeast [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978, 75: 1929-1933.
- [14] Ballance D J, Buxton F P, Turner Q, et al. Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1983, 112: 284-289.
- [15] 高静, 李艳波, 柯希望, 等. PEG 介导的苹果腐烂病菌原生质体转化[J]. 微生物学报, 2011, 51(9): 1194-1199.
- [16] 张新明. 大麦坚黑粉菌遗传转化体系优化及其侵染机制初探[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [17] 高兴喜, 杨谦. PEG-CaCl₂ 介导苏云金杆菌 CryIA(b) 基因转化哈茨木霉[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2005, 37(10): 1333-1336.
- [18] 黄大昉, 张杰, 张中鸽, 等. 棉花枯萎病菌的遗传转化[J]. 自然科学进展, 1994, 4(3): 351-353.
- [19] 刘铜, 侯巨梅, 陈捷, 等. PEG 介导的玉米弯孢叶斑病菌遗传转化[J]. 植物保护, 2012, 38(6): 27-30.
- [20] 韩华. 疏绵状嗜热孢菌遗传转化体系的建立及蛋白激酶定位和敲除载体的构建[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [21] 张云峰, 邵磊. 根癌农杆菌电击转化条件的研究[J]. 淮阴师范学院学报(自然科学版), 2009, 8(3): 243-249.
- [22] 朱文静, 马飞, 孙春玉, 等. 电击法介导的人参大片段 DNA 转化灵芝原生质体的研究[J]. 特产研究, 2015, 1(8): 21-28.
- [23] 周庆新. 丝状真菌遗传转化系统的建立[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
- [24] Bölker M, Böhnert H U, Braun K H, et al. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI)[J]. Molecular and General Genetics, 1995, 248 (5): 547-552.
- [25] Sánchez O, Navarro R E, Aguirre J. Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration (REMI) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1998, 258: 89-94.
- [26] Tanaka A, Shiotani H, Yamamoto M, et al. Insertional mutagenesis and cloning of the genes required for biosynthesis of the host-specific AK-toxin in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1999, 12(8): 691-702.
- [27] 王秋华. 尖孢镰刀菌的 DNA 转化及其转化子表型的初步分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [28] 迟归兵, 魏士平, 潘洪玉, 等. 稻瘟菌 REMI 突变体库的构建[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2004, 19(3): 287-289.

及人参锈腐病菌的活性^[18]。翟熙伦的研究表明,蒙氏假单胞菌 4A1 菌株发酵液中的活性物质可破坏 TMV 粒体,对病毒产生钝化作用,破坏病毒蛋白亚基之间的作用力,使病毒粒体缺乏完整性,从而无法在寄主体内增殖,降低病毒的侵染能力^[19]。本研究的 3A 菌株为蒙氏假单胞菌,对烟草漂浮育苗中 TMV 的钝化效果显著,对植物病毒病的防治有潜在的应用价值,但是其与 TMV 在烟草植株内的作用机制还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 刘勇,江红甲,布云红,等.烟草漂浮苗花叶病毒病重要初侵染源的探讨[J].浙江农业科学,2008(4):483-485.
 - [2] Zasadzinski J A N, Sammon M J, Meyer R B, et al. Freeze-fracture imaging of ordered phases of *Tobacco mosaic virus* in water [J]. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 1986, 138 (1): 211-229.
 - [3] Pande S, Rao J N, Upadhyaya H D, et al. Farmers' participatory integrated management of foliar diseases of groundnut [J]. *International Journal of Pest Management*, 2001, 47(2): 121-126.
 - [4] 朱贤朝,王彦亭,王智发.中国烟草病害[M].北京:中国农业出版社,2002:196-197.
 - [5] 曹毅,郭玉双,陆宁,等.3种消毒剂对烟草漂浮育苗中 TMV 的钝化效果[J].湖北农业科学,2012,51(19):4280-4283.
 - [6] 王凤龙.烟草病毒病综合防治技术[J].烟草科技,2002(4):43-45.
 - [7] Mulvania M. Cultivation of the virus of tobacco mosaic by the method of Olitsky [J]. *Science*, 1925, 62: 37.
 - [8] 于银霞,张飞云,田兆丰,等.微生物源抗植物病毒物质及其抗病毒机理的研究进展[J].生物技术通报,2009(2):54-58.
 - [9] 吴德喜,杨程,李凡,等.二氧化氯对烟草漂浮育苗剪叶刀具的消毒作用研究[J].云南农业大学学报,2006,21(2):188-191.
 - [10] 刘勇,杨宇虹,陈学军,等.烟草漂浮育苗中剪叶工具消毒剂评价[J].中国烟草学报,2007,13(1):41-43.
 - [11] 刘勇.漂浮育苗池中烟草花叶病毒消毒剂的筛选[J].河南农业大学学报,2008,42(1):40-45.
 - [12] 曾嵘,滕永忠,张庆刚,等.污染 TMV 的烤烟漂浮育苗盘和育苗池的消毒方法研究[J].云南农业大学学报,2004,19(6):692-695.
 - [13] 陈年春.农药生物测定技术[M].北京:北京农业大学出版社,1991:219-226.
 - [14] McGrath K C, Thomas-Hall S R, Cheng Chuting, et al. Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75 (2): 172-176.
 - [15] 翟熙伦,杨金广,申莉莉,等.一株对 TMV 和 PVY 具有拮抗活性生防菌的筛选与鉴定[J].中国农业科学,2012,45(11):2180-2188.
 - [16] 毕建华,杨金广,欧阳明安,等.黏质沙雷氏菌次生代谢物对 TMV 的抑制机理[J].中国农业科学,2014,(5):912-922.
 - [17] Wang S L, Lin Y T, Liang T W, et al. Purification and characterization of extracellular lipases from *Pseudomonas monteilii* TKU009 by the use of soybeans as the substrate [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36(1): 65-73.
 - [18] 徐丽,严雪瑞,傅俊范,等.五味子内生拮抗细菌的筛选与鉴定[J].植物保护,2009,35(3):47-50.
 - [19] 翟熙伦.蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*)的活性小分子物质对 TMV、PVY 的抑制作用[D].北京:中国农业科学院,2012.
- (责任编辑:田 喆)
-
- (上接 28 页)
- [29] 伏建国,强胜,朱云枝.链格孢菌原生质体的制备与限制性内切酶介导整合(REMI)转化的致病性诱变[J].菌物学报,2005,24(3):407-413.
 - [30] 刘振盼.玉米大斑病菌 REMI 转化体系的建立和分子核型的初步分析[D].保定:河北农业大学,2007.
 - [31] 刘丽华.限制性内切酶介导(REMI)玉米大斑病菌的遗传转化及其转化子表型分析[D].保定:河北农业大学,2007.
 - [32] Lu S, Lyngholm L, Yang G, et al. Tagged mutations at the Tox1 locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration [J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91: 12649-12653.
 - [33] Granado J D, Kertesz-Chaloupkova K, Aebi M, et al. Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus* [J]. *Molecular and General Genetics*, 1997, 256: 28-36.
 - [34] Shuster J R, Connelley M B. Promoter-tagged restriction enzyme-mediated insertion (PT-REMI) mutagenesis in *Aspergillus niger* [J]. *Molecular and General Genetics*, 1999, 262: 27-34.
 - [35] 张文芸,周益民,范永坚,等.稻瘟病菌限制酶介导整合 REMI 转化的致病性诱变[J].南京师大学报(自然科学版),2002,25 (2): 17-21.
 - [36] 胡仕凤.木霉菌 REMI 突变株构建及其功能挖掘[D].长沙:湖南农业大学,2007.
 - [37] 周礼红,陈平,赵永霞,等. REMI 介导红曲霉遗传转化条件的优化[J].湖北农业科学,2012,51(18):4129-4133.
 - [38] 周礼红,王正祥,诸葛健.红曲霉不同转化方法的比较[J].遗传,2006,28(4):479-485.
 - [39] 冯建海,张玮,李兴红,等.甘蓝枯萎病菌 REMI 转化体系的建立[J].植物保护,2013,39(2):108-111.
 - [40] 夏淑春,王学武,张茹琴,等.玉米弯孢叶斑病菌 REMI 白化突变体的筛选与致病性测定[J].生物技术通报,2014,12: 111-116.
 - [41] 张鑫,刘爱芬,张玮,等.葡萄溃疡病菌限制性内切酶介导整合方法的建立及转化子库的构建[J].微生物学通报,2013,40 (7): 1272-1278.
 - [42] 包其郁,孙永巧,王慧峰,等.影响电转化效率的几个因素探讨[J].温州医学院学报,2003,33(1):9-11.
- (责任编辑:田 喆)