

# 水稻纹枯病菌 pTHPR1 转化子的生物学特性

杨迎青<sup>1,2</sup> 李明海<sup>1,3</sup> 杨媚<sup>1</sup> 郑丽<sup>1</sup> 赵东<sup>1</sup> 周而勋<sup>1</sup>

1. 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642; 2. 江西省农业科学院植物保护研究所, 南昌 330200;  
3. 华侨大学学科建设办公室, 泉州 362011

**摘要** 构建了根癌农杆菌介导的水稻纹枯病菌遗传转化系统, 并获得了一批 pTHPR1 转化子。为明确这些转化子的生物学特性, 在转化子库中抽取 10 个经过验证的转化子, 从温度、pH 值、碳源、氮源和光照 5 个方面比较了它们与野生型菌株(GD-118)在生长速度、菌落颜色、菌核颜色和菌核数量的差异。结果表明: 在 25 °C 和 35 °C 且 pH 值为 5.0、7.0、8.0 时, 以葡萄糖和半乳糖为碳源、以甘氨酸为氮源且完全黑暗的条件下培养, 转化子与野生型菌株的菌丝生长速度有明显差异, 有些转化子菌丝生长速度明显快于野生型菌株, 有些转化子菌丝生长速度则明显慢于野生型菌株; 在 10 °C 和 35 °C 且 pH 值为 4.0、5.0、6.0 时, 以葡萄糖为碳源、以硝酸钠和硝酸钾为氮源且完全黑暗的条件下培养, 转化子与野生型菌株的菌核数量和颜色均有明显差异。

**关键词** 水稻纹枯病; 立枯丝核菌; pTHPR1 转化子; 菌丝; 菌核

**中图分类号** S 435.111.42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)01-0034-06

水稻纹枯病为水稻三大病害之一<sup>[1]</sup>, 可对水稻生产造成巨大的经济损失, 严重时能使水稻减产 50%。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, 分布和寄主范围广, 能引起多种植物的纹枯病或立枯病<sup>[2-6]</sup>。由于立枯丝核菌(*R. solani*)种内成员复杂, 故被认为是一个复合种, 种内通常采用菌丝融合群(anastomosis group, AG)进行再分类<sup>[7-8]</sup>。目前, 立枯丝核菌(*R. solani*)至少被划分为 14 个融合群, 有些融合群再根据寄主范围、致病性、同工酶谱和分子生物学特征等划分为不同的亚群, 水稻纹枯病菌属于 AG-1 融合群的 IA 亚群, 即 *R. solani* AG-1 IA<sup>[9]</sup>。遗传转化方法有多种, 是获得所需目的基因的一个简单方法, 其中根癌农杆菌介导的转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, AT-MT)是近 10 年来发展起来的一种新技术, 现已成为真菌遗传转化和基因克隆的有效工具<sup>[10-12]</sup>。

研究真菌突变体的生物学性状, 对明确真菌生长发育调控因子具有重要意义<sup>[13-14]</sup>。Robinson 等<sup>[15]</sup>利用 PEG 诱导整合技术对立枯丝核菌 AG-3 进行了转化, 但获取的转化子生长缓慢, 14 d 后停

止生长。最近, 笔者构建了根癌农杆菌介导的水稻纹枯病菌转化系统, 并获得了一批转化子<sup>[16-17]</sup>。为明确这些转化子的生物学特性, 笔者从转化子库中抽取具有 pTHPR1 质粒 T-DNA 插入的转化子并作为研究对象, 比较转化子与野生型菌株在不同温度、pH 值、碳源、氮源和光照等培养条件下, 其生长速度、菌落颜色、菌核颜色和菌核数量等方面的差异, 旨在为进一步研究该病菌的菌丝生长与菌核形成调控因子和相关基因提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

水稻纹枯病菌(*R. solani*)的转化子(编号分别为 T466、T779、T1129、T1346、T1966、T2219、T2308、T2346、T2669 和 T2743)已通过 *hph* 和 *Vir* 基因双重 PCR 验证<sup>[17]</sup>, 具有 pTHPR1 质粒 T-DNA 插入。出发菌株(野生型强致病力菌株 GD-118)由笔者所在实验室保存。

### 1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)(用于不同温度、pH 值和光照条件下转化子和野生型菌株的培

收稿日期: 2012-04-30

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx3-16)

杨迎青, 博士, 助理研究员. 研究方向: 植物病理学与真菌学. E-mail: yyq8295@163.com

通讯作者: 周而勋, 博士, 教授. 研究方向: 植物病理学与真菌学. E-mail: exzhou@scau.edu.cn.

养)及 Czapek 固体培养基(用于不同碳源和氮源条件下转化子和野生型菌株的培养)的配方与制备均参照方中达<sup>[18]</sup>的方法。

### 1.3 试验方法

在每个 PDA 平板中央移入 1 块直径为 5 mm 的菌丝块,每处理 3 次重复。观察与比较转化子和野生型菌株在不同温度(5、10、15、20、25、30、35、40 ℃)、pH 值(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0)、碳源(果糖、葡萄糖、半乳糖、甘露醇和蔗糖)、氮源(硝酸钠、硝酸钾、硫酸铵、天冬酰胺、甘氨酸)和光照(连续光照、半日光暗交替和完全黑暗)培养条件下生物学特性的差异。当生长最快的菌株几乎长满直径 9 cm 的 Petri 培养皿时,开始测量全部供试菌株的菌落直径,14 d 后记录菌落颜色、菌核颜色并测定菌核数量,计算公式与数据统计均参照唐芳<sup>[19]</sup>的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 温度对病菌生长的影响

试验结果表明,水稻纹枯病菌 pTHPR1 转化子和野生型菌株在 25 ℃和 35 ℃培养条件下生长速度

差异显著(表 1)。由表 1 可知,25 ℃培养条件下,转化子 T779、T1966、T2219、T2308 和 T2346 的菌丝生长速度明显慢于野生型菌株(GD-118),而转化子 T1129 和 T1346 的菌丝生长速度明显快于野生型菌株。35 ℃培养条件下,转化子 T1966、T2219 和 T2308 的菌丝生长速度明显慢于野生型菌株,而转化子 T1129 和 T1346 的菌丝生长速度明显高于野生型菌株。

观察结果表明,水稻纹枯病菌 pTHPR1 转化子和野生型菌株在 10 ℃和 35 ℃培养下菌核差异显著。10 ℃培养条件下,转化子 T466、T1966、T2346 和 T2669 产生的菌核明显少于野生型菌株,而转化子 T1129、T1346 和 T2219 产生的菌核明显多于野生型菌株。35 ℃培养条件下,转化子 T466、T2308 和 T2346 菌核颜色为褐色,菌核数量较少;转化子 T2669 和 T2743 菌核颜色为深褐色,菌核数量较多;野生型菌株菌核颜色为浅褐色,菌核数目中等;转化子 T779 和 T2219 的菌核颜色分别为浅黄色和深褐色;转化子 T779 和 T1966 产生的菌核明显少于野生型菌株;转化子 T1129 和 T2219 产生的菌核明显多于野生型菌株。

表 1 转化子和野生型菌株在不同温度条件下菌丝生长速度差异的比较<sup>1)</sup>

Table 1 Comparison of differences in mycelial growth rate of transformants and wild type isolate at different temperatures

菌株 Isolate	5 ℃	10 ℃	15 ℃	20 ℃	25 ℃	30 ℃	35 ℃	40 ℃
GD-118	0.00 a	0.60±0.00 b	0.87±0.15 d	2.67±0.29 cb	4.73±0.38 bcd	7.23±0.45 ba	1.77±0.15 dc	0.00 a
T466	0.00 a	0.00 c	0.80±0.20 de	2.30±0.10 cd	4.27±0.06 efcd	6.27±0.21 b	1.93±0.21 bc	0.00 a
T779	0.00 a	0.00 c	0.60±0.00 e	2.30±0.50 cd	3.60±0.36 fg	6.43±0.15 b	1.60±0.30 de	0.00 a
T1129	0.00 a	0.63±0.06 ba	1.33±0.06 ba	3.67±0.46 a	6.03±0.451 a	6.80±0.61 ba	2.40±0.10 a	0.00 a
T1346	0.00 a	0.65±0.05 a	0.97±0.21 dc	2.40±0.10 cd	5.47±0.47 ba	7.00±0.10 ba	2.17±0.06 ba	0.00 a
T1966	0.00 a	0.60±0.12 b	1.13±0.12 bc	2.40±0.10 cd	3.87±0.32 efg	6.50±0.10 ba	1.20±0.27 f	0.00 a
T2219	0.00 a	0.00 c	0.63±0.06 e	2.13±0.42 cd	4.30±0.44 efcd	7.47±0.84 a	1.40±0.30 ef	0.00 a
T2308	0.00 a	0.60±0.00 b	0.60±0.00 e	1.87±0.12 d	4.00±0.50 efgd	7.00±0.70 ba	1.40±0.10 ef	0.00 a
T2346	0.00 a	0.00 c	1.40±0.10 a	2.50±0.50 cb	3.37±0.55 g	4.30±0.82 c	1.50±0.10 def	0.00 a
T2669	0.00 a	0.00 c	0.87±0.15 d	2.37±0.23 cd	4.63±0.15 ecd	6.50±0.44 ba	1.50±0.10 def	0.00 a
T2743	0.00 a	0.60±0.00 b	1.47±0.06 a	3.03±0.06 b	4.90±0.76 bc	7.03±0.57 ba	2.33±0.15 a	0.00 a

1)表中数据为 3 次重复的平均值(菌落直径/cm)±标准误。同列数据采用 Duncan 氏新复极差法(DMRT)进行差异显著性分析,数据后不同字母表示在 5%水平上差异显著(下表同)。Data in the table were the average (diameter of colony/cm)±SE of three replicates. Data in the same column were analyzed for significant difference by using DMRT, the data with the different letters are significantly difference at 5% level (the same as following tables).

### 2.2 pH 值对病菌生长的影响

试验结果表明,水稻纹枯病菌 pTHPR1 转化子和野生型菌株在 pH 值为 5.0、7.0、8.0 的培养条件下菌丝生长差异显著(表 2)。pH 值 5.0 时,转化子 T2743 的菌丝生长速度明显慢于野生型菌株,而转化子 T1966、T2308 和 T2346 的菌丝生长速度明

显快于野生型菌株。pH 值 7.0 时,转化子 T779、T1346 和 T2669 的菌丝生长速度明显慢于野生型菌株,而转化子 T1129 的菌丝生长速度明显快于野生型菌株。pH 值 8.0 时,转化子 T2743 的菌丝生长速度明显慢于野生型菌株,而转化子 T466 和 T1966 的菌丝生长速度明显快于野生型菌株。

表 2 转化子和野生型菌株在不同 pH 值下菌丝生长速度差异的比较

Table 2 Comparison of differences in mycelial growth rate of transformants and wild type isolate at different pH values

菌株 Isolate	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0	pH 10.0
GD-118	3.37±0.40 ba	6.33±0.29 ba	6.87±0.15 d	7.30±0.20 ba	3.60±0.17 bc	2.00±0.62 cbd	0.00 a	0.00 a
T466	3.57±0.40 ba	6.47±0.06 a	7.10±0.10 cd	7.47±0.06 a	3.93±0.12 ba	3.13±0.32 a	0.00 a	0.00 a
T779	3.03±0.15 b	5.70±0.52 c	7.07±0.12 cd	7.20±0.17 ba	2.33±0.29 e	2.17±0.29 cbd	0.00 a	0.00 a
T1129	3.43±0.12 ba	6.23±0.21 ba	7.13±0.12 bcd	7.10±0.27 b	4.43±0.12 a	2.10±0.36 cbd	0.00 a	0.00 a
T1129	3.40±0.40 ba	6.53±0.06 a	7.13±0.12 bcd	7.23±0.21 ba	2.43±0.51 e	2.07±0.21 cbd	0.00 a	0.00 a
T1966	3.53±0.25 ba	6.43±0.12 a	7.27±0.25 bc	7.07±0.12 b	3.77±0.25 b	2.50±0.00 b	0.00 a	0.00 a
T2219	3.47±0.35 ba	6.37±0.12 ba	7.17±0.15 bcd	7.50±0.20 a	3.17±0.29 dc	2.13±0.23 cbd	0.00 a	0.00 a
T2308	3.87±0.15 a	6.53±0.06 a	7.47±0.25 ba	7.13±0.23 b	3.00±0.50 d	1.87±0.12 cd	0.00 a	0.00 a
T2346	3.33±0.15 ba	6.00±0.20 bc	7.63±0.15 a	7.47±0.06 a	3.77±0.25 b	2.30±0.20 cb	0.00 a	0.00 a
T2669	3.57±0.40 ba	5.97±0.15 bc	7.17±0.21 bcd	7.50±0.00 a	2.83±0.29 de	1.90±0.27 cd	0.00 a	0.00 a
T2743	1.97±0.15 c	4.10±0.17 d	5.97±0.25 e	5.77±0.06 c	3.17±0.29 dc	1.70±0.10 d	0.00 a	0.00 a

观察结果表明,水稻纹枯病菌 pTHPR1 转化子和野生型转化子在 pH 值为 4.0、5.0、6.0 的培养条件下差异显著。pH 值 4.0 时,转化子 T1346、T1966、T2346 和 T2669 产生的菌核量中等,转化子 T2219 产生的菌核量比较多,转化子 T2743 无菌核或极少形成菌核,而野生型菌株产生的菌核量较少;转化子 T466、T1346、T1966 和 T2669 的菌核为褐色,野生型菌株的菌核为浅褐色。pH 值 5.0 时,转化子 T779、T2346 和 T2743 产生的菌核量比较少,转化子 T1129、T2219 和 T1346 产生的菌核量比较多,而野生型菌株产生的菌核量中等;转化子 T2346 菌核颜色为浅褐色,转化子 T466、T779、T1129、T1966、T2219、T2308、T2669 和 T2743 的菌核为褐色,而野生型菌株的菌核为深褐色。pH 值 6.0 时,转化子 T1346、T2346 和 T2743 产生的菌核量比较少,转化子 T466、T779、T1129、T1966、T2308 和 T2669 产生的菌核量中等,而野生型菌株产生的菌核量比较多;转化子 T2346 的菌核为浅褐

色, T466、T779、T1129、T1966、T2219、T2308、T2669 和 T2743 的菌核为褐色,而野生型菌株的菌核为深褐色。

### 2.3 碳源对病菌生长的影响

试验结果表明,水稻纹枯病菌 pTHPR1 转化子和野生型菌株在葡萄糖和半乳糖作碳源时菌丝生长差异显著(表 3)。由表 3 可知,以葡萄糖作碳源时,转化子 T2743 的菌丝生长速度明显慢于野生型菌株,而转化子 T779、T1346、T2219 和 T2346 的菌丝生长速度明显快于野生型菌株。以半乳糖作为碳源时,转化子 T466、T779、T1346 和 T2346 的菌丝生长速度明显快于野生型菌株。

观察结果表明,水稻纹枯病菌 pTHPR1 转化子和野生型菌株在以葡萄糖作为碳源时菌核差异显著。以葡萄糖作为碳源时,转化子 T2743 的菌核数目少于野生型菌株,转化子 T466、T1346、T1966 和 T2308 的菌核颜色不同于野生型菌株。

表 3 转化子和野生型菌株在不同碳源条件下菌丝生长速度差异的比较

Table 3 Comparison of differences in mycelial growth rate of transformants and wild type isolate in different carbon sources

菌株 Isolate	蔗糖 Sucrose	葡萄糖 Glucose	半乳糖 Galactose	甘露醇 Mannitol	果糖 Fructose
GD-118	8.50±0.00 b	6.57±0.40 ed	6.77±0.25 dc	7.97±0.47 a	4.67±0.29 a
T466	8.77±0.06 a	6.97±0.06 bedc	7.40±0.17 bac	8.50±0.00 a	4.17±0.35 bac
T779	8.53±0.29 b	8.07±0.50 a	7.47±0.25 ba	8.23±0.64 a	4.37±0.15 ba
T1129	8.67±0.06 ba	6.90±0.10 edc	6.83±0.47 bdc	8.47±0.15 a	4.17±0.58 bac
T1346	8.70±0.00 ba	7.60±0.10 ba	7.83±0.29 a	8.23±0.25 a	3.70±0.20 c
T1966	8.50±0.20 b	6.60±0.66 ed	6.57±0.12 d	8.57±0.06 a	4.10±0.10 bc
T2219	8.70±0.00 ba	7.50±0.50 bac	7.00±0.50 bdc	8.57±0.12 a	4.20±0.17 bac
T2308	8.50±0.00 b	6.67±0.29 ed	6.83±0.29 bdc	8.03±0.64 a	4.20±0.10 bac
T2346	8.53±0.06 b	7.13±0.15 bdc	7.33±0.47 bac	8.00±0.44 a	3.87±0.23 bc
T2669	8.50±0.00 b	6.33±0.35 e	5.83±0.29 e	8.50±0.00 a	4.20±0.20 bac
T2743	7.60±0.10 c	4.77±0.25 f	5.10±0.36 f	7.17±0.29 b	3.10±0.17 d

## 2.4 氮源对病菌生长的影响

试验结果表明,水稻纹枯病菌 pTHPR1 转化子和野生型菌株在以甘氨酸作为氮源时菌丝生长差异显著(表 4)。由表 4 可知,以甘氨酸作为氮源时,转化子 T2743 的菌丝生长速度明显慢于野生型菌株,而转化子 T466、T1129、T1346、T1966、T2308、T2346 和 T2669 的菌丝生长速度明显快于野生型菌株。

表 4 转化子和野生型菌株在不同氮源条件下菌丝生长速度差异的比较

Table 4 Comparison of differences in mycelial growth rate of transformants and wild type isolate in different nitrogen sources

菌株 Isolate	硝酸钠 Sodium nitrate	硝酸钾 Potassium nitrate	甘氨酸 Glycine	天冬酰胺 Asparagine	硫酸铵 Ammonium sulphate
GD-118	8.50±0.00 bc	8.50±0.00 ba	6.57±0.12 e	8.67±0.12 b	8.67±0.06 a
T466	8.43±0.12 c	8.77±0.06 a	7.30±0.36 cd	8.77±0.06 ba	8.60±0.17 ba
T779	8.50±0.00 bc	8.60±0.10 ba	7.00±0.20 ed	8.70±0.00 ba	8.67±0.06 a
T1129	8.57±0.12 bac	8.23±0.40 b	8.43±0.12 a	8.70±0.00 ba	8.50±0.00 ba
T1346	8.53±0.06 bac	8.40±0.36 ba	7.67±0.06 bc	8.57±0.15 b	8.63±0.12 ba
T1966	8.70±0.00 a	8.67±0.06 ba	7.73±0.64 bc	8.60±0.10 ba	8.50±0.27 ba
T2219	8.57±0.06 bac	8.53±0.25 ba	7.10±0.17 ecd	8.60±0.00 ba	8.60±0.10 ba
T2308	8.53±0.06 bac	8.60±0.00 ba	7.30±0.72 cd	8.57±0.12 b	8.50±0.00 ba
T2346	8.67±0.12 ba	8.70±0.17 ba	8.03±0.06 ba	8.63±0.12 ba	8.70±0.00 a
T2669	8.67±0.06 ba	8.60±0.10 ba	7.63±0.12 bcd	8.70±0.00 ba	8.50±0.00 ba
T2743	7.40±0.17 d	7.33±0.47 c	5.90±0.36 f	8.53±0.21 b	8.37±0.32 b

## 2.5 光照对病菌生长的影响

试验结果表明,水稻纹枯病菌 pTHPR1 转化子和野生型菌株在完全黑暗的培养条件下,菌丝生长差异显著(表 5)。由表 5 可知,T1966、T2308 和 T2743 的生长速度明显慢于野生型菌株,T1346 和

观察结果表明,水稻纹枯病菌 pTHPR1 转化子和野生型菌株在以硝酸钠和硝酸钾作为氮源时菌核差异显著。以硝酸钠作为氮源时,转化子 T779 和 T2743 产生的菌核少于野生型菌株,所有转化子的菌核颜色均与野生型菌株的菌核颜色不同。以硝酸钾作为氮源时,转化子 T2743 产生的菌核数量少于野生型菌株,转化子 T1129、T1966、T2219、T2308、T2346 和 T2743 的菌核颜色均不同于野生型菌株。

T2669 生长速度明显快于野生型菌株。观察结果表明,转化子和野生型菌株在完全黑暗的培养条件下,菌核差异较为显著。T779 和 T2743 产生的菌核数量略少于野生型菌株,T2219、T2308 和 T2743 的菌核颜色不同于野生型菌株。

表 5 转化子和野生型菌株在不同光照条件下菌丝生长速度差异的比较

Table 5 Comparison of differences in mycelial growth rate of transformants and wild type isolate under different illuminations

菌株 Isolate	连续光照 Continuous illumination	半日光照 12 h illumination	完全黑暗 Complete dark
GD-118	7.77±0.31 bac	7.97±0.29 bac	7.70±0.63 bc
T466	7.67±0.06 bac	6.65±0.65 d	7.90±0.10 bac
T799	7.53±0.23 bc	7.00±0.72 dc	7.97±0.75 bac
T1129	7.40±0.10 c	8.27±0.15 a	8.00±0.27 bac
T1346	7.87±0.06 ba	8.25±0.25 a	8.93±0.12 a
T1966	6.97±0.15 d	7.23±1.22 bdc	5.63±0.15 e
T2219	6.95±0.05 d	7.05±0.45 dc	7.00±1.00 dc
T2308	7.93±0.12 a	7.77±0.32 bac	6.33±0.19 ed
T2346	7.45±0.35 c	8.15±0.15 ba	7.40±0.10 bc
T2669	6.93±0.40 d	8.23±0.29 a	8.50±0.46 ba
T2743	6.60±0.00 d	8.10±0.00 ba	6.00±0.44 ed

## 3 讨论

真菌遗传转化是获取致病与生长调控等相关基因的重要手段。Robinson 等<sup>[15]</sup>利用聚乙二醇(PEG)诱导转化技术对立枯丝核菌(*R. solani*) AG-3 融合群的菌株进行了转化,但得到的转化子生长

速度缓慢,14 d 后停止生长,菌落直径仅为 25~35 mm。笔者成功对水稻纹枯病菌(*R. solani* AG-1 IA)进行了遗传转化,获得的转化子能够基本正常生长,与 Robinson 等<sup>[15]</sup>的结论存在较大差异。存在差异的可能原因有两个方面:一方面,采用的质粒和转化方法不同,笔者采用 pTHPR1 质粒和根癌农

杆菌介导的转化(ATMT)技术<sup>[16-18]</sup>,而 Robinson 等<sup>[15]</sup>采用 pAXHY2 及 pES200 质粒和聚乙二醇(PEG)诱导转化技术;另一方面,采用立枯丝核菌融合群的不同也有可能导致研究结果的差异,笔者以 AG-1 IA 为材料进行转化,而 Robinson 等<sup>[15]</sup>则是以 AG-3 为材料进行转化。

遗传转化获取的植物病原真菌转化子,在菌落形态、菌丝形状、菌丝横隔间距、孢子颜色和产孢数量等方面均会发生一定变化<sup>[13]</sup>,在不同温度、pH 值和碳氮源条件下也表现出一定差异<sup>[14]</sup>。笔者从温度、pH 值、碳源、氮源和光照等 5 个方面对挑取的 10 个水稻纹枯病菌(*R. solani* AG-1 IA)pTHPR1 转化子进行了生物学性状观察和比较。结果表明:在不同培养条件下,转化子生长速度及菌核颜色和数目,相对于野生型菌株均表现出较为明显的差异。本研究与迟玉杰等<sup>[13]</sup>和刘限等<sup>[14]</sup>对哈茨木霉转化子生物学特性的研究结果一致,即转化子的培养性状发生了改变。迟玉杰等<sup>[13]</sup>将哈茨木霉及其转化子在 PDA 培养基上进行平板点植和小室培养,于 40 倍显微镜下观察其菌体形态,发现转化子在菌落形态、菌丝形状、菌丝横隔间距、孢子颜色和产孢数量等方面均发生了一定变化。刘限等<sup>[14]</sup>研究发现,部分木霉菌转化子的孢子萌发率高于野生菌株,对高低温的适应能力也表现出差异,不同 pH 值条件下,木霉菌转化子的培养形态和产孢方式均发生一定改变。木霉菌转化子对蛋白质和天冬氨酸氮源的利用较好,对麦芽糖和葡萄糖这 2 种碳源的利用较好。不同木霉菌转化子的培养性状也不同,有些菌株的菌落颜色为黄色,而其他菌株为绿色。

笔者探讨了水稻纹枯病菌(*R. solani* AG-1 IA)pTHPR1 转化子区别于野生型菌株的生物学特性,明确了该病菌经遗传转化后导致生长速度、菌核颜色及数目等方面发生改变的程度,研究结果可为开展该病菌菌丝生长与菌核产生调控因子及其相关基因克隆的工作奠定基础。

## 参 考 文 献

- LEE F N, RUSH M C. Rice sheath blight: a major rice disease [J]. *Plant Disease*, 1983, 67(7): 829-832.
- YANG Y Q, YANG M, LI M H, et al. Isolation and characterization of a phytotoxin from *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight [J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2011, 23(8): 3500-3508.
- 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[J]. *植物病理学报*, 2002, 32(3): 214-218.
- 邹成佳, 唐芳, 杨媚, 等. 华南 3 省(区)水稻纹枯病菌的生物学性状与致病力分化研究[J]. *中国水稻科学*, 2011, 25(2): 206-212.
- 黄世文, 王玲, 陈惠哲, 等. 氮肥施用量和施用方法对超级杂交稻纹枯病发生的影响[J]. *植物病理学报*, 2009, 39(1): 104-109.
- 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[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(2): 198-203.
- CUBETA M A, VILGALYS R. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex [J]. *Phytopathology*, 1997, 87: 480-484.
- OGOSHI A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn [J]. *Ann Rev Phytopathol*, 1987, 25: 125-143.
- 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 [J]. *Mycol Res*, 2007, 111: 891-900.
- MULLINS E D, KANG S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58: 2043-2052.
- COMBIER 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* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 220(1): 141-148.
- 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 [J]. *Current Genetics*, 2005, 48(1): 1-17.
- 迟玉杰, 杨谦, 宋颖琦. 对哈茨木霉转化子菌体形态观察及抗药性测定[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2002, 34(6): 784-788.
- 刘限, 高增贵, 庄敬华, 等. 哈茨木霉菌 T21 转化体生物学特性研究[J]. *植物保护*, 2006, 32(6): 71-75.
- ROBINSON H L, DEACON J W. Protoplast preparation and transient transformation of *Rhizoctonia solani* [J]. *Mycol Res*, 2001, 105(11): 1295-1303.
- 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[J]. *中国水稻科学*, 2010, 24(6): 617-622.
- YANG Y Q, YANG M, LI M H, et al. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA [J]. *Rice Science*, 2011, 18(4): 297-303.
- 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 40, 46-50.
- 唐芳. 水稻纹枯病菌的致病力分化及遗传多样性研究[D]. 广州: 华南农业大学图书馆, 2009: 1-78.

## Biological characteristics of pTHPR1 transformants of rice sheath blight fungus *Rhizoctonia solani* Kühn

YANG Ying-qing<sup>1,2</sup> LI Ming-hai<sup>1,3</sup> YANG Mei<sup>1</sup> ZHENG Li<sup>1</sup> ZHAO Dong<sup>1</sup> ZHOU Er-xun<sup>1</sup>

1. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Institute of Plant Protection, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China;

3. Discipline Office, Huaqiao University, Quanzhou 362011, China

**Abstract** In the previous study, the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for rice sheath blight fungus *Rhizoctonia solani* Kühn was established and a lot of pTHPR1 transformants was obtained in our laboratory. To confirm the biological characteristics of pTHPR1 transformants, 10 verified transformants were selected from the pTHPR1 transformant library. The differences in biological characteristics such as growth rate, colony colour, sclerotial colour, sclerotial number and other aspects between the 10 transformants and the wild type isolate (GD-118) were compared in 5 aspects, i. e. temperature, pH value, carbon sources, nitrogen sources and illumination. The results revealed that the growth rates of these transformants had greater differences when compared with that of the wild type isolate at the following conditions, i. e. cultivation temperature at 25 °C and 35 °C, pH 5.0, pH 7.0 and pH 8.0 of PDA at cultivation phase, glucose and galactose as the carbon sources, glycine as the nitrogen sources, and full dark as the illumination condition. The growth rates of several transformants were faster and the others were slower than that of the wild type isolate. The results also indicated that the sclerotia of transformants had greater differences in both numbers and colours when compared with that of the wild type isolate at the following conditions, i. e. cultivation temperature at 10 °C and 35 °C, pH 4.0, pH 5.0 and pH 6.0 of PDA at cultivation phase, glucose as the carbon sources, sodium nitrate and potassium nitrate as the nitrogen sources, and full dark as the illumination condition.

**Key words** sheath blight of rice; *Rhizoctonia solani* Kühn; pTHPR1 transformants; mycelium; sclerotium

(责任编辑:陈红叶)