

文章编号: 1674-7054(2021)04-0412-07



根癌农杆菌介导的新暗色柱节孢菌遗传转化

王 猛, 王周雯, 丁 一, 徐 敏, 郭攀阳, 刘成立,
李佳雪, 李 涛, 韦双双, 汤 华

(海南大学 热带作物学院/海南热带生物资源可持续利用国家重点实验室培育基地, 海口 570228)

摘要: 火龙果是一种新兴的热带水果, 随着种植面积的不增大, 病害问题日趋严重, 其中危害最大的是火龙果溃疡病, 导致火龙果溃疡病的病原菌为新暗色柱节孢菌(*Neoscytalidium dimidiatum*)。为了研究新暗色柱节孢菌的遗传变异与基因功能, 必须建立有效的遗传转化体系, 但目前国内外未见相关报道。本研究通过构建含有 *gpdA* 启动子、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein)和潮霉素(Hygromycin)抗性基因为筛选标记的双元表达载体, 对新暗色柱节孢菌的孢子进行根癌农杆菌介导的遗传转化, 成功获得了阳性转化子。通过荧光显微镜观察表明, 阳性转化子菌丝能够产生绿色荧光, 野生型菌丝不能产生绿色荧光; PCR 检测证明了转化子基因组中整合了潮霉素抗性基因。因此, 本研究成功实现了根癌农杆菌介导下绿色荧光蛋白基因在新暗色柱节孢菌中的稳定遗传表达, 为研究新暗色柱节孢菌对火龙果溃疡病的致病机制奠定了技术基础。

关键词: 火龙果溃疡病; 新暗色柱节孢菌; 潮霉素抗性基因; 绿色荧光蛋白; 农杆菌介导的遗传转化

中图分类号: Q 949.3; S 667.9 **文献标志码:** A

引用格式: 王猛, 王周雯, 丁一, 等. 根癌农杆菌介导的新暗色柱节孢菌遗传转化 [J]. 热带生物学报, 2021, 12(4): 412-418. DOI: [10.15886/j.cnki.rdsxb.2021.04.002](https://doi.org/10.15886/j.cnki.rdsxb.2021.04.002)

火龙果 (*Hylocereus polyrhizus*) 属于仙人掌科的热带植物, 原产于中美洲和南美洲^[1]。火龙果果实颜色亮丽并含有多酚类化合物^[2], 红肉火龙果含有甜菜红素^[3-4]等丰富的生物活性成分, 具有抗氧化、清肠通便等多种生理功能, 有很高的营养价值和经济价值^[5-7]。近年来, 火龙果在我国种植面积增长十分迅速, 截至 2020 年, 我国火龙果种植面积已经超过 6.67 万 hm²。随着种植面积的扩大, 火龙果的病害问题日趋严重, 其中危害最严重的是火龙果溃疡病^[8-9]。2012 年, 火龙果溃疡病在中国台湾首次被报道^[10], 随后在马来西亚、以色列、墨西哥、美国、尼加拉瓜和中国的广东、广西、云南、贵州、海南等火龙果种植区均有发现^[9,11-12], 火龙果溃疡病严重危害火龙果的产量和品质, 在夏季, 火龙果茎部溃疡病病株发病率高达 60%, 该病具有发病快、传播广、危害大等特点。经研究表明, 引起该病的病原菌为新暗色柱节孢菌 (*Neoscytalidium dimidiatum*)^[13], 该病菌主要损害火龙果树的茎和果实, 导致果实和茎条先出现白色病斑, 随着时间的推移转变为棕色, 最后表现为茎腐病、果实开裂^[14-15]、内部褐腐病和黑腐病^[11,14], 此病害在高温和潮湿的环境中更具侵袭性^[16], 对火龙果的产量、质量产生有害影响, 进而影响其商业价值^[17]。目前, 已经分离和鉴定了火龙果溃疡病的致病菌, 但关于其遗传转化体系的研究仍为空白, 而有效的遗传转化体系对于新暗色柱节孢菌致病机理及相关致病基因的研究将起到至关重要的作用。真菌遗传转化主要分为原生质体转化和农杆菌介导转化 2 种途径^[18]。原生质体法操作简单, 但转化效率低、变异率高, 而且 PEG 有一定的毒性, 可能会对原生质体的生长有一定影响, 制备原生质体程序繁琐, 因此, 在丝状真菌

收稿日期: 2021-03-04

修回日期: 2021-06-30

基金项目: 2020 海南大学世界一流学科建设经费项目和成果培育专项课题(RZZX201904); 农村农业部“火龙果种质资源保护及种质创新项目”(18200032-1); 火龙果良种联合攻关项目(HD-KYH-2019042)

第一作者: 王猛(1993-), 男, 海南大学热带作物学院 2019 级硕士研究生. E-mail: 1632556340@qq.com

通信作者: 汤华(1974-), 男, 教授. 研究方向: 作物遗传育种与分子生物学. E-mail: thtiger@163.com

的转化应用中受限^[4,19-21]。2001年 MULLINS 等^[22]通过构建二元载体,通过农杆菌的介导实现了对镰刀菌的有效遗传转化,到目前为止已有大量的农杆菌介导转化真菌的报道^[23],但是因为真菌材料的性质差异,所用农杆菌菌株和真菌分离株及共培养条件的不同,对不同的真菌物种进行优化是一项艰巨的任务。迄今为止,国内外还没有关于农杆菌介导新暗色柱节孢菌转化的相关报道,其在新暗色柱节孢菌中的有效性尚待进一步研究。笔者利用农杆菌介导转化法,将含有潮霉素抗性基因(*hyg*)和绿色荧光蛋白基因(*mGFP*)的双元表达载体转化到新暗色柱节孢菌中,并在阳性转化子中检测绿色荧光蛋白的表达,旨在为进一步研究新暗色柱节孢菌的菌丝生长过程、形态特征、致病菌与火龙果之间的互作致病机制等提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒 新暗色柱节孢菌是本实验室从红皮红肉火龙果茎条分离鉴定并保存的。双元表达载体 pG-Hyg-GFP 是以 pCambia1300 为骨架,插入 *trpC* 启动子、潮霉素抗性基因(*hyg*)和绿色荧光蛋白基因(*mGFP*),方法参照 MULLINS 等^[22]。其中潮霉素抗性基因来源于构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 的 *trpC* 启动子控制其转录,绿色荧光蛋白基因来源于 3-磷酸甘油脱氢酶基因(*gpdA*)启动子控制其转录。利用化学转化法转入根癌农杆菌 AGL-1 中,获得农杆菌 pG-Hyg-GFP(图 1)。

1.2 培养基及试剂 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:称取 PDA 培养基粉 62.5 g,加水定容至 1 000 mL,灭菌后 4 °C 保存。马铃薯葡萄糖液体

(PDB)培养基:称取 PDB 培养基粉 26.1 g,加水定容至 1 000 mL,调 pH 至 7.0 后灭菌,4 °C 保存。基本培养基(minimal medium, MM): KH_2PO_4 3.625 g, K_2HPO_4 5.125 g, NaCl 0.375 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.250 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.165 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0062 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.250 g,定容至 1 000 mL,室温储存。AIM 培养基:MM 培养基 400 mL, 0.5%(V/V)甘油 5 mL, MES 8.5 g, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过滤除菌的葡萄糖 5 mL,将 pH 调至 5.3,定容至 1 000 mL,固体加入 15 g 的琼脂粉,室温储存。LB 培养基:酵母提取物 5 g,胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g,将 pH 调至 7.0,4 °C 储存。噻孢霉素(Cefotaxime):称取 1 g Cef 溶于 1 mL 灭菌水中,配置成 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,过滤分装,-20 °C 储存。乙酰丁香酮(Acetosyringone):称取 196.2 mg AS,溶于 10 mL 二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide),配置成 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, -20 °C 储存。卡那霉素(Kanamycin):称取 50 mg Kan,溶于 1 mL 的灭菌水中,配置成 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, -20 °C 储存。利福平(Rifampicin):称取 0.25 g Rif,溶于 10 mL 无菌水中,过滤分装,-20 °C 储存。

1.3 潮霉素对新暗色柱节孢抑制浓度的筛选 将野生的新暗色柱节孢菌丝接到 PDA 培养基平板上培养 3~5 d,先用 5~7 mL 灭菌水洗涤菌丝,再用枪头把菌丝悬浮液吸至含有 50 mL 的 PDB 培养基中,在摇床中 28 °C 培养 3 d 后,用 3 层擦镜纸过滤获得孢子悬浮液,并稀释成 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,吸取 20 μL 孢子悬浮液点接到分别含有 0、10、20、30、40、50、60、70 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素 B 的 PDA 平板上,置于 28 °C 恒温培养箱中培养 7 d,每天观察其生长状况并记录。

1.4 农杆菌的转化

1.4.1 农杆菌 AGL-1 的活化和诱导培养 农杆菌转化参照文献^[22]的方法培养。首先将-80 °C 保存的含有重组质粒的农杆菌 AGL-1 菌液接到液体 LB 培养基中(含有 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Kan 和 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的

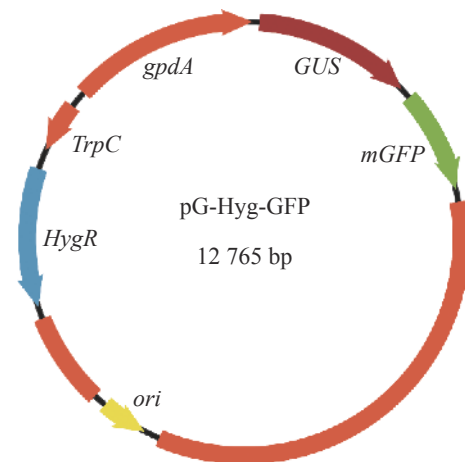


图 1 pG-Hyg-GFP 质粒图

Fig. 1 Plasmid map of pG-Hyg-GFP

Rif), 28 °C, 180 r·min⁻¹ 摇床培养至浑浊; 然后取培养好的农杆菌 50 μL 接种到 MM 培养基中(含有 100 μg·mL⁻¹ 的 Kan 和 25 μg·mL⁻¹ 的 Rif), 28 °C, 180 r·min⁻¹ 摇床培养 2 d, 室温, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 加入 20 mL 的 AIM 液体培养基(含有 200 μmol·L⁻¹ 的 AS 和 40 μmol·L⁻¹ 的 MES)重悬, 5 000 r·min⁻¹ 室温离心 10 min, 弃上清; 再用 IM 液体培养基(含有 200 μmol·L⁻¹ 的 AS 和 40 μmol·L⁻¹ 的 MES)调农杆菌 $A_{600}=0.15$, 28 °C, 180 r·min⁻¹ 摇床培养 12 h 至 $A_{600}=0.6$, 备用。

1.4.2 新暗色柱节孢孢子的培养 挑取适量的菌丝于 PDB 培养基中(含 100 μg·mL⁻¹ 的 Kan), 28 °C 暗培养 3 d, 经 3 层擦镜纸过滤, 收集孢子悬浮液, 调整孢子悬浮液的密度为 1×10^7 个·mL⁻¹, 备用。

1.4.3 根癌农杆菌与新暗色柱节孢孢子的共培养 将 $A_{600}=0.6$ 的根癌农杆菌与新暗色柱节孢的分生孢子悬浮液(1×10^7 个·mL⁻¹)按体积比为 1:1 的比例混合, 取 200 μL 混合液, 用涂布器均匀的涂布于铺有硝酸纤维素滤膜 IM(含 200 μmol·L⁻¹ 的 AS 和 40 μmol·L⁻¹ 的 MES)固体培养基上, 25 °C 培养 48 h。

1.4.4 新暗色柱节孢菌转化子的筛选 将完成共培养 48 h 的硝酸纤维素薄膜转移至 PDA 培养基上(含 200 μg·mL⁻¹ Cef、50 μg·mL⁻¹ 的潮霉素 B), 25 °C 暗培养 7 d 后, 用接种环挑取转化子于新的 PDA 培养基上(含 200 μg·mL⁻¹ Cef、50 μg·mL⁻¹ 的潮霉素 B)培养 7 d, 进行检测。

1.5 绿色荧光蛋白的表达与检测 在无菌条件下, 将转化子接种到选择培养基上, 25 °C 培养 7 d, 滴一滴 dH₂O 于载玻片中央, 用接种针挑取嫩的菌丝于水中, 将菌丝打散, 盖上盖玻片, 在黑暗条件下, 将载玻片放到带有绿色激发滤光 460 ~ 550 nm 的 OLMPUS IX71 荧光显微镜下, 观察绿色荧光蛋白表达情况。先用自然光找到菌丝体, 再关闭自然光改为蓝光, 分别记录在自然光和绿光下的曝光情况, 并用 OLMPUS 相机拍照。

1.6 PCR 分析转化子 将转化子用接种环接种在选择培养基上培养 7 d, 待长满培养皿时, 用接种环将刮取菌丝并利用真菌微量 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 用于 PCR 检测。具体操作如下: 以新暗色柱节孢菌全基因组 DNA 为模板, 根据二元表达载体 (pG-Hyg-GFP) 上的潮霉素磷酸转移酶基因设计上下游引物, 分别为 HPH-F: 5'-AATTCGTCGAAAAAAGAAAAGG-3' 和 HPH-R: 5'-CTATTTCTTTGCCCTCGGACG-3', PCR 扩增体系为: TaKaRa Ex Taq 0.25 μL, 10×buffer 5 μL, dNTP mixture 4 μL, 模板 2 μL, 上下游引物各 1 μL, dH₂O 补充至 50 μL。PCR 扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 100 s, 30 次循环, 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物片段大小为 1 604 bp。

1.7 转化子遗传稳定性检测 从获得的转化子中随机挑选出 12 个转化子接种至不含有潮霉素抗性的 PDA 培养基上培养, 3 d 后从边缘挑取菌丝接种至另一个不含有潮霉素抗性的 PDA 培养基上培养, 连续转接 5 代, 再将菌丝转接至含有潮霉素抗性 PDA 的平板上培养, 观察转化子的情况。

2 结果与分析

2.1 新暗色柱节孢菌 (*Neoscytalidium dimidiatum*) 的遗传转化

2.1.1 新暗色柱节孢菌对潮霉素及卡那霉素的敏感性测试 将野生型的新暗色柱节孢菌株接在含有不同浓度的潮霉素 B 的 PDA 平板上, 其在含有 20 μg·mL⁻¹ 潮霉素 B 的 PDA 培养基平板上受到明显的抑制, 在 40 μg·mL⁻¹ 潮霉素 B 的 PDA 培养基平板上能够完全抑制其生长, 为了防止假阳性, 选择培养基选用 50 μg·mL⁻¹ 潮霉素的浓度。

2.1.2 新暗色柱节孢菌转化子的筛选 将农杆菌和新暗色柱节孢菌在 IM 培养基上共培养 48 h 后, 将硝酸纤维素薄膜转移至含有 50 μg·mL⁻¹ 的潮霉素的 PDA 培养基上培养 7 d, 培养基上会长出新的菌丝。将其再挑到新的含 50 μg·mL⁻¹ 潮霉素 B 和 200 μg·mL⁻¹ Cef(抑制农杆菌生长)的 PDA 培养基上培养。结果表明, 新暗色柱节孢菌转化子可以在含有 50 μg·mL⁻¹ 潮霉素 B 的 PDA 平板上生长(图 2), 而野生型菌株不生长, 说明新生新暗色柱节孢菌转化子具有潮霉素抗性。

2.2 新暗色柱节孢菌转化子中绿色荧光蛋白表达情况 在荧光显微镜的蓝光(488 nm)激发下, 观察和检测 *mGFP* 的表达情况。图 3-A、3-C 分别为野生型新暗色柱节孢菌和转化子在荧光显微镜自然光中的

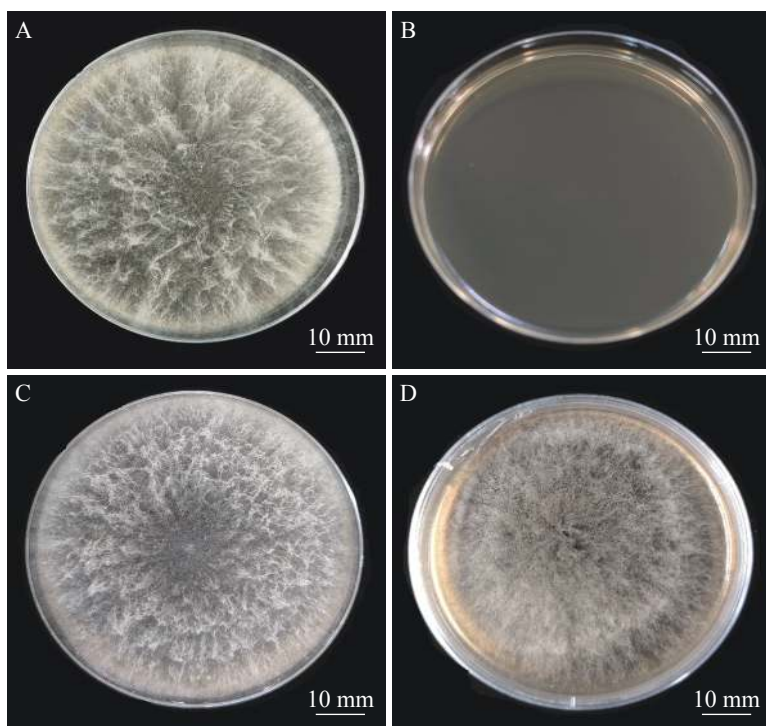


图 2 新暗色柱节孢菌野生型与转化子的菌丝生长情况对比

新暗色柱节孢菌野生型(A)和转化子(C)在不含有抗性的 PDA 平板上 28 °C 培养 1 周情况对比; 新暗色柱节孢菌野生型(B)和转化子(D)在含有 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 潮霉素 B 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cef 的 PDA 平板上 28 °C 培养 7 d 情况对比。

Fig. 2 Comparison of hyphae growth between wild-type and transformant of *Neoscytalidium dimidiatum*

Comparison of the wild - type *Neoscytalidium dimidiatum* (A) and putative transformants (C) cultured on the Potato Dextrose Agar (PDA) medium without presence of antibiotics for 7 days at 28 °C; comparison of the growth of the wild-type *Neoscytalidium dimidiatum* (B) and putative transformants (D) cultured on the PDA medium supplemented with 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of hygromycin and 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of cefotaxime for 7 days at 28 °C.

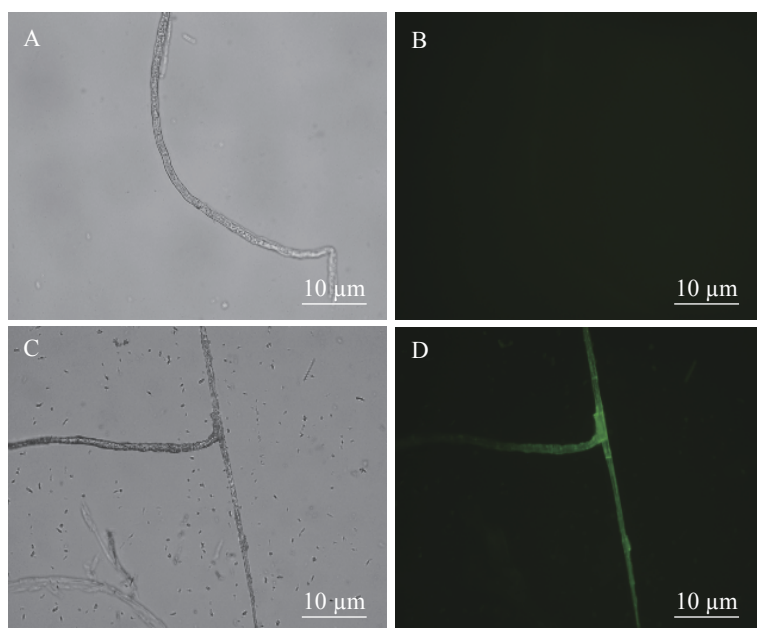


图 3 mGFP 荧光蛋白在新暗色柱节孢菌转化子中的表达情况检测

野生型新暗色柱节孢菌和转化子在明场、荧光场的绿色荧光蛋白 (mGFP) 表达情况。明场成像 A、C; 荧光场成像 B、D。

Fig. 3 Detection of the expression of mGFP fluorescent protein in the transformants of *Neoscytalidium dimidiatum*

The expression of green fluorescent protein (mGFP) in bright field and fluorescent field of wild-type *Neoscytalidium dimidiatum* and transformant. A, C: Bright-field imaging; B, D: Fluorescence imaging.

形态;图 3-B、3-D 分别为野生型新暗色柱节孢菌和转化子在荧光显微镜荧光场中的形态。在荧光场中,新暗色柱节孢菌的野生型菌丝观察不到荧光,而新暗色柱节孢菌的转化子的菌丝上有明显的绿色荧光。说明在转化子中,*GFP* 基因已成功转到新暗色柱节孢菌中并得以表达。

2.3 新暗色柱节孢菌转化子的 PCR 检测 随机挑取 3 个新暗色柱节孢菌转化子在新的 PDA 培养基上(含有 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 潮霉素 B)培养,待菌丝长满平板。分别提取新暗色柱节孢菌转化子和野生型的 DNA,以 HPH-F 和 HPH-R 作为上下游引物进行 PCR 检测,结果(图 4)表明,野生型对照没有扩增出条带,转化子能够扩增出 1 604 bp 的潮霉素基因片段,说明 T-DNA 已插入新暗色柱节孢菌中。

2.4 新暗色柱节孢菌转化子遗传稳定性的检测 将挑取的 12 个转化子接种至无潮霉素抗性的 PDA 培养基上连续培养 5 代,再转接至含有潮霉素抗性的 PDA 培养基上培养,发现所有的转化子均可以正常生长,说明转化子获得了抗潮霉素抗性,可以稳定遗传。



图 4 转化子的 PCR 检测

M: DNA marker; 1~3: 野生型新暗色柱节孢菌,作为阴性对照;4: 含有潮霉素基因的质粒,阳性对照;5~7: 随机挑选的新暗色柱节孢菌转化子。

Fig. 4 PCR identification of transformants

M: DNA Marker DL2000; 1~3: Wild type *Neoscytalidium dimidiatum* as a negative control; 4: Plasmid with hygromycin gene as a positive control; 5~7: Randomly selected transformants of *Neoscytalidium dimidiatum*.

3 讨论

通过构建二元表达载体,利用构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的 *trpC* 启动子控制潮霉素磷酸转移酶的转录;利用构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的 3-磷酸甘油脱氢酶基因(*gpdA*)启动子控制绿色荧光蛋白(*mGFP*)的转录。在农杆菌介导下,成功将含有潮霉素抗性基因和含有绿色荧光蛋白基因(*mGFP*)导入火龙果溃疡病致病菌—新暗色柱节孢菌中,并通过 PCR 扩增检测到潮霉素基因片段,通过荧光显微镜检测到绿色荧光蛋白的表达,说明外源基因能够整合到新暗色柱节孢菌基因组上并成功表达;将转化子菌株转接 5 代仍然可以在含有潮霉素 B($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 PDA 培养基上生长,说明其具有遗传稳定性。

目前,国内外对于新暗色柱节孢菌的研究较少,相关的文献报道基本都处于新暗色柱节孢菌的分离和鉴定阶段^[1,17,24],也有在不同物种上发现了新暗色柱节孢菌的报道,如在加利福尼亚的无花果^[25]、马来西亚的菠萝^[26]、中国广西的剑麻^[27]等上面,均发现了新暗色柱节孢菌,导致植物发生溃疡病。近几年有关于火龙果对新暗色柱节孢菌侵染的响应研究报道,如 2019 年, XU 等^[28]从海南红皮红肉火龙果中分离得到新暗色柱节孢菌,使用 Illumina RNA-Seq 技术研究了红肉火龙果(*H. polyrhizus*)对 *Neoscytalidium dimidiatum* 的宿主反应;2020 年, XU 等^[9]全面概述了红肉火龙果在转录水平上响应 *Neoscytalidium dimidiatum* 感染的 *HpLRR* 家族基因;2021 年, PAN 等^[29]采用定量蛋白组学分析法研究了火龙果对 *Neoscytalidium dimidiatum* 感染的免疫反应,但新暗色柱节孢菌对火龙果的致病性机理的研究还未见报道。

建立成功的转化系统是研究基因功能的前提,目前已经有利用该方法获得转化子并开展基因功能的研究报道^[30-31]。因此,建立有效的暗色柱节孢菌遗传转化体系,对于研究暗色柱节孢菌的致病基因及其基因功能极其重要。虽然已有大量农杆菌介导的真菌遗传转化体系被建立,但未见暗色柱节孢菌遗传转化相关的报道。本研究成功获得稳定表达的转化子,将为后续开展暗色柱节孢菌侵染火龙果的发育发展进程和探究暗色柱节孢菌侵染火龙果的致病机理研究提供材料;还可以为后续突变体库的建立提供技术基础,通过筛选表型异常的突变体开展基因功能的研究。

参考文献:

[1] SOLSONA G S, LOPEZ P, PALMATEER A J. First Report of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Stem Canker on Dragon

- fruit (*Hylocereus* spp.) in Puerto Rico [J]. *Plant Disease*, 2021, 100(7): 190 – 191.
- [2] TENORE G C, NOVELLINO E, BASILE A. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts [J]. *Journal of Functional Foods*, 2012, 4(1): 129 – 136.
- [3] WYBRANIEC S, PLATZNER I, GERESH S, et al. Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus* [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(8): 1209 – 1212.
- [4] 任艺华, 牛长凯, 韩立新, 等. PEG 介导原生质体转化构建链格孢荧光菌株及其侵染苹果花器特性[J]. *菌物学报*, 2020, 39(12): 2277 – 2284.
- [5] COS P, DE BRUYNE T, HERMANS N, et al. Proanthocyanidins in health care: current and new trends [J]. *Current medicinal chemistry*, 2004, 11(10): 1345 – 1359.
- [6] WU L C, HSU W H, CHEN Y C, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya [J]. *Food Chemistry*, 2005, 95(2): 319 – 327.
- [7] HERBACH K M, ROHE M, STINTZING F C, et al. Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives [J]. *Food Research International*, 2006, 39(6): 667 – 677.
- [8] YI R H, LIN Q L, MO J J, et al. Fruit internal brown rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on pitahaya in Guangdong province [J]. *China, Australasian Plant Disease Notes*, 2015, 10(1): 13.
- [9] XU M, LIU C L, FU Y, et al. Molecular characterization and expression analysis of pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) HpLRR genes in response to *Neoscytalidium dimidiatum* infection [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(9): 4 – 15.
- [10] CHUANG M F, NI H F, YANG H R, et al. First report of stem canker disease of pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan [J]. *Plant Disease*, 2012, 96(6): 906 – 906.
- [11] EZRA D, LIARZI O, GAT T, et al. First report of internal black rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* (Pitahaya) Fruit in Israel [J]. *Plant Disease*, 2013, 97(11): 1513 – 1513.
- [12] SANAHUJA G, LOPEZ P, PALMATEER A J. First report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing stem and fruit canker of *Hylocereus undatus* in Florida [J]. *Plant Disease*, 2016, 100(7): 1499 – 1499.
- [13] 戴俊, 王会会, 符碧海, 等. 火龙果溃疡病和茎腐病原菌的生物学特性测定[J]. *中国南方果树*, 2017, 46(1): 78 – 82.
- [14] 易润华, 甘罗军, 晏冬华, 等. 火龙果溃疡病原菌鉴定及生物学特性[J]. *植物保护学报*, 2013, 40(2): 102 – 108.
- [15] 张荣, 刘爱媛, 白成艳, 等. 火龙果溃疡病的症状观察和病原菌鉴定[J]. *果树学报*, 2013, 30(5): 854 – 856.
- [16] WANG F, ZHANG R, YUAN Z. et al. Biological prevention and control of pitaya fruit canker disease using endophytic fungi isolated from papaya [J]. 2021, *Archives of Microbiology*, 142(11): 1 – 8.
- [17] XU M, PENG Y, QI Z, et al. Identification of *Neoscytalidium dimidiatum* causing canker disease of pitaya in Hainan, China [J]. *Australasian plant pathology*, 2018, 47(5): 547 – 553.
- [18] 王毅, 王晨晨, 周旭, 等. 根癌农杆菌介导的地衣型真菌 *Cladonia metacorallifera* 的转化[J]. *菌物学报*, 2015, 34(2): 246 – 251.
- [19] WANG HL, KIM SH, SIU H, et al. Transformation of *sapstaining* fungi with hygromycin B resistance plasmids pAN 7-1 and pCB1004, *Mycological Research* [J]. 1999, 103(1): 77 – 80.
- [20] 毛雨, 王丹, 黄占斌, 等. 微生物原生质体融合育种技术及其应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(1): 93 – 97.
- [21] 彭轶楠, 王沛雅, 巩晓芳, 等. 生防真菌寡雄腐霉原生质体的制备及再生[J]. *菌物学报*, 2017, 36(6): 679 – 690.
- [22] MULLINS E D, CHEN X, ROMAINE P, et al. Agrobacterium-mediated transformation of *fusarium oxysporum*: An Efficient Tool for Insertional mutagenesis and gene transfer [J]. *Phytopathology*, 2001, 91(2): 130 – 80.
- [23] MICHELSE C B, HOOYKAAS P 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.
- [24] HONG C F, GAZIS R, CRANE J H, et al. Prevalence and Epidemics of *Neoscytalidium* Stem and Fruit Canker on Pitahaya (*Hylocereus* spp.) in South Florida [J]. *Plant disease*, 2020, 104(5): 1433 – 1438.
- [25] GUSELLA G, MORGAN D, MICHAILIDES T. Further investigation on Limb Dieback of Fig (*Ficus carica*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in California [J]. *Plant disease*, 2020, 105(2): 324 – 330.
- [26] KURUPPU M, SIDDIQUI Y, AHMAD K, et al. First report of postharvest stem end rot disease on MD2 pineapple fruits caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Malaysia [J]. *Plant disease*, 2021, 105(5): 102 – 105.
- [27] XIE H H, LONG L Y, HUANG S P, et al. First Report of Black Spot Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on Sisal in Guangxi, China [J]. *Plant disease*, 2021, 105(3): 701 – 707.
- [28] XU M, LIU C L, LUO J, et al. Transcriptomic de novo analysis of pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) canker disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(10): 2561 – 2571.
- [29] PAN L, ZHANG R, LU F. et al. Comparative proteomic analysis of the fungal pathogen *Neoscytalidium dimidiatum* infection in the pitaya [J]. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2021, 62(3): 1 – 11.

- [30] ZHUANG, Z Z, GUI, H L, CHUN H L. et al. Conidiophore stalk-less1 encodes a putative zinc-finger protein involved in the early stage of conidiation and mycelial infection in *Magnaporthe oryzae* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2009, 22(4): 402 – 410.
- [31] 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.

***Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation of *Neoscytalidium dimidiatum* causing Stem Canker on Pitaya**

WANG Meng, WANG Zhouwen, DING Yi, XU Min, GUO Panyang, LUI Chengli,
LI Jiaxue, LI Tao, WEI Shuangshuang, TANG Hua

(College of Tropical Crops, Hainan University; Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of
Tropical Bioresources, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: In recent years, pitaya (*Hylocereus* spp.) has gradually become a newly-emerging tropical fruit. With the continuous increase of planting area, diseases infecting pitaya have become more serious. Among them stem canker is the most important disease, which is caused by *Neoscytalidium dimidiatum*. To explore the genetic variation and gene function of *N. dimidiatum*, an effective genetic transformation system must be established. However, there have been no reports documented at home or abroad in this aspect. A binary expression vector containing *gpdA* promoter, green fluorescent protein (*mGFP*) and hygromycin resistance gene as screening markers was constructed to establish a genetic transformation system for *N. dimidiatum* through *Agrobacterium tumefaciens*-mediation, and positive transformants from the spores of *N. dimidiatum* were successfully generated. Fluorescence microscope observations showed that the positive transformant hyphae could produce green fluorescence, while the wild-type hyphae could not produce green fluorescence. The PCR test confirmed the integration of hygromycin resistance gene in the transformant genome. Therefore, this *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system produced stable genetic expression of *mGFP* gene in *N. dimidiatum*, which lays a technical foundation for the further study of the pathogenicity mechanism of dragon fruit canker disease.

Keywords: pitaya canker disease; *Neoscytalidium dimidiatum*; hygromycin resistant gene; green fluorescent protein; *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation

(责任编辑: 万迎朗 责任编辑: 钟云芳)