

DOI:10.11686/cyxb2024480

http://cyxb.magtech.com.cn

付瑶, 王子贤, 陈泰祥, 等. 党参黄芯病菌的鉴定及绿色荧光蛋白基因转化. 草业学报, 2025, 34(11): 136-149.

FU Yao, WANG Zi-xian, CHEN Tai-xiang, et al. Identification and green fluorescent protein gene transformation of the causal agent of yellow-core disease of *Codonopsis pilosula*. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(11): 136-149.

## 党参黄芯病菌的鉴定及绿色荧光蛋白基因转化

付瑶<sup>1,2</sup>, 王子贤<sup>1,2</sup>, 陈泰祥<sup>3</sup>, 晋玲<sup>1,2</sup>, 马晓辉<sup>1,2</sup>, 王艳<sup>1,2\*</sup>

(1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃兰州 730000; 2. 西北中藏药省部共建协同创新中心, 甘肃兰州 730000; 3. 草种创新与草地农业生态系统全国重点实验室, 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃兰州 730020)

**摘要:** 党参黄芯病降低党参的产量和质量, 在明确该病病原菌分类地位的基础上, 构建增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 标记的党参黄芯病菌转化株, 为研究病原菌在党参植株体内的侵染特性提供可视化跟踪手段。基于形态学和多基因位点联合的方法, 明确病原菌的分类地位。采用根癌农杆菌介导法 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT), 将带有潮霉素磷酸转移酶基因 (hygromycin phosphotransferase, *HygB*) 和增强型绿色荧光蛋白基因 *EGFP* 的双元载体转入党参黄芯病菌分生孢子中并筛选出遗传稳定的转化子。结果表明, 党参黄芯病常年田间发病率为 20%~30%。病原菌为弯镰孢菌党参变种, 遗传转化共获得 138 株阳性转化子, 转化效率约为 46 个转化子·10<sup>-6</sup> 个孢子。随机挑选的 4 株阳性转化子经 6 次继代培养, 具有稳定的潮霉素 B 抗性和绿色荧光表达, 其中转化子 EGFP7-3 与 EGFP7-4 生物学特性及致病性和野生型党参黄芯病菌无显著差异, 表明绿色荧光蛋白基因已成功转入党参黄芯病菌中, 转化子 EGFP7-3 与 EGFP7-4 稳定遗传且致病力不受影响。本研究为党参黄芯病菌致病机理的研究提供了良好的材料和技术支撑。

**关键词:** 党参; 黄芯病; 病原鉴定; EGFP; ATMT; 基因转化

## Identification and green fluorescent protein gene transformation of the causal agent of yellow-core disease of *Codonopsis pilosula*

FU Yao<sup>1,2</sup>, WANG Zi-xian<sup>1,2</sup>, CHEN Tai-xiang<sup>3</sup>, JIN Ling<sup>1,2</sup>, MA Xiao-hui<sup>1,2</sup>, WANG Yan<sup>1,2\*</sup>

1. School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Northwest Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine Co-constructed by Gansu Province & MOE of PRC, Lanzhou 730000, China; 3. State Key Laboratory of Herbage Improvement and Grassland Agro-ecosystems, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

**Abstract:** Yellow-core disease of *Codonopsis pilosula* significantly reduces its yield and quality. First, we clarified the taxonomic position of the pathogen causing the disease, and developed EGFP-labeled transformants of the causative fungus, providing a means for visual tracking of infection characteristics within the host plants. The pathogen was clarified by using both morphological and multi-gene locus analyses. ATMT was used to introduce a binary vector carrying the *HygB* and *EGFP* into the conidia of the yellow-core disease fungus. Genetically stable transformants were screened. The results indicated that the field incidence of yellow-core disease is 20%–30%.

收稿日期: 2024-12-03; 改回日期: 2025-03-03

基金项目: 中药保障与创新能力提升项目(甘中医药综函[2024]14号), 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-21), 甘肃省科技计划项目(23ZDFA013-1), 甘肃省自然科学基金(22JR5RA458), 甘肃省2023年度优秀研究生“创新之星”(2023CXZX-762)和西北中藏药省部共建协同创新中心开放基金项目(Xbzzy-2022-02)资助。

作者简介: 付瑶(2000-), 女, 山东青岛人, 在读硕士。E-mail: a225265153@163.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: gswangyan101@163.com

The pathogen is identified as *Fusarium curvatum* var. *codonopsisidis*. Genetic transformation produced 138 positive transformants at an efficiency of approximately 46 transformants per  $10^6$  conidia. Four randomly selected positive transformants, after six subcultures, exhibited stable hygromycin B resistance and green fluorescence expression. Transformants EGFP7-3 and EGFP7-4 showed no significant differences in biological characteristics or pathogenicity compared to the wild-type strain, indicating successful and stable integration *EGFP* without affecting virulence. This study provides valuable materials and technical support for investigating the pathogenesis and control of yellow-core disease in *C. pilosula*.

**Key words:** *Codonopsis pilosula*; yellow-core disease; pathogen identification; EGFP; ATMT; gene transformation

党参为桔梗科植物党参(*Codonopsis pilosula*)、素花党参(*Codonopsis pilosula* var. *modesta*)或川党参(*Codonopsis tangshen*)的干燥根<sup>[1]</sup>。具补中益气、养血生津之功效<sup>[2]</sup>,是常用补益药,用于治疗脾肺虚弱、气短心悸等症<sup>[3]</sup>,临床应用广泛。甘肃是党参道地产区之一,2024年甘肃省党参种植面积超50000 hm<sup>2</sup>,产量为558000 t<sup>[4]</sup>,随着种植面积的逐年增大,病原菌逐年积累,病害发生严重。据报道,党参病害主要有根腐病[慢性黄腐型(*Fusarium oxysporum*);急性青枯型(*Fusarium oxysporum*)]、锈病(*Puccinia campanumoeae*)、斑枯病(*Septoria codonopsisidis*)、白粉病(*Sphaerotheca codonopsisidis*)和灰霉病(*Botrytis cinerea*)<sup>[5-8]</sup>。急性青枯型根腐病,俗称“黄芯病”。症状主要表现为茎叶急性萎蔫,根部维管束变为黄色至红褐色,随着病情发展,主根软腐,须根萎缩,最终全株死亡<sup>[9]</sup>。该病主要发生在党参移栽后的苗期,引起大面积死苗。自2014年以来,每年该病发病率均在10%~30%,重病田块可达65%,已成为甘肃省党参生产中的主要病害<sup>[9-10]</sup>。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是一种发光蛋白,具有稳定的发光特性,可借助荧光共聚焦显微镜实时定位观察其在活细胞中的表达<sup>[11-12]</sup>,常作为报告蛋白用于标记真菌,以研究病原菌侵染动态、定殖策略和侵染机制<sup>[13]</sup>。农杆菌介导法(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)可以将克隆载体所带GFP插入到自身Ti质粒的T-DNA区,并将带有GFP的T-DNA片段整合到真菌基因组中<sup>[14]</sup>,利用荧光标记筛选阳性转化子。该方法已广泛应用于真菌的遗传转化,国内外学者已利用ATMT成功将引起多种植物根腐病的尖孢镰刀菌进行了GFP标记<sup>[15-20]</sup>,并进行了侵染机制研究。

系统查阅资料,党参黄芯病菌侵染党参的侵染途径和定殖策略等均无研究报道,因此,本研究拟利用绿色荧光蛋白标记技术和农杆菌介导法构建党参黄芯病菌突变体,为观察党参黄芯病菌对党参的侵染过程提供增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)标记菌株。同时,本研究构建遗传转化体系,也可用于党参黄芯病致病基因的筛选与克隆等研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌株和载体:感受态大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、农杆菌LBA4404购自北京擎科生物科技股份有限公司;质粒pCAMBIA1303-gpdA-EGFP-TrpC-Hygro购自武汉淼灵生物科技有限公司,该质粒以潮霉素B为抗性标记,绿色荧光蛋白为报告基因(图1)。

主要试剂:潮霉素B(hygromycin B, HygB),购自BBI生命科学有限公司;卡那霉素(kanamycin, Kan),购自北京兰杰柯科技有限公司;利福平(rifampicin, Rif),购自上海源叶生物科技有限公司;吗啉乙磺酸、头孢噻肟钠、乙酰丁香酮(acetosyringone, AS),购自上海麦克林生化科技股份有限公司;质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO),购自广州赛国生物科技有限公司;引物由上海生工生物工程技术服务公司合成。

### 1.2 病原菌的分离与鉴定

**1.2.1 标样采集及病原菌的分离纯化** 2021年7-8月在甘肃省党参主产区陇西县首阳镇(104.41° E,

35.07° N, 海拔 1973 m)、渭源县会川镇(103.97° E, 35.12° N, 海拔 2248 m)分批分次调查党参黄芯病发病情况,记录发病率、严重度、症状,拍照,采集标本并压制标本。通过常规组织分离法分离致病菌,将优势菌纯化并保存于 4 °C 备用。

**1.2.2 形态学观察** 使用打孔器打取菌龄为 7 d 的党参黄芯病菌菌饼(d=4 mm),接种于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA, 成分:马铃薯 200 g, 葡萄糖 10 g, 琼脂 15 g, 水 1000 mL)、康乃馨叶片琼脂[carnation leaf agar, CLA, 成分:康乃馨叶片(3~5 mm<sup>2</sup>)90% 乙醇处理 20 s, 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 10 min, 无菌水冲洗 5 次, 50 °C 烘干 2 h, 置于 WA 培养基(水 1000 mL, 琼脂 20 g)中央]和低营养合成琼脂(synthetic nutrient-poor agar, SNA, 成分:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, KCl 0.5 g, 葡萄糖 0.2 g, 蔗糖 0.2 g, 琼脂 23 g, 水 1000 mL)<sup>[21]</sup>培养基上,于 25 °C, 12 h 光/12 h 暗交替培养。第 7 天观察并记录致病菌菌落的形态及颜色,于光学显微镜(Nikon ECLIPSE 80i, 北京荣兴光恒科技有限公司)下观察病原菌大型分生孢子、小型分生孢子、厚垣孢子形态、大小及隔膜数量;产孢梗形态;大孢子基细胞与顶细胞的形状,每一项测定 30 个数据。

**1.2.3 分子生物学鉴定** 将党参黄芯病菌新鲜菌丝在液氮中充分研磨,用真菌基因组 DNA 提取试剂盒(BioTeKe, 无锡百泰克生物技术有限公司)提取病原菌基因组 DNA。分别采用引物对 EF1/EF2、Fa/G2R 和 5f2/7cr<sup>[22-24]</sup>扩增 *EF-1 $\alpha$* 、*RPB1* 和 *RPB2* 共 3 个片段。PCR 反应体系(20  $\mu$ L):ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L, 2 $\times$ Mix 10  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 上下游引物各 1  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L。PCR 扩增条件:95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 以 48.0 °C、54.3 °C 和 52.1 °C 分别扩增 *EF-1 $\alpha$*  片段, *RPB1* 片段和 *RPB2* 片段, 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物由生工生物工程(上海)有限公司进行纯化和测序。将测序结果在 GenBank 进行 Blast 比对, 下载相似度较高的菌株序列, 并使用 MEGA 7.0 软件采用最大似然法构建系统发育树, 以确定致病菌系统发育地位。

**1.2.4 致病性测定** 将党参黄芯病菌活化 7 d, 用无菌水制备浓度为 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cfu·mL<sup>-1</sup> 孢子悬浮液, 选取 1 龄健康党参苗, 使用灭菌针在根的芽头部位针刺 3 次, 取 50 mL 孢子悬浮液接种于刺伤部位以及植株周围土壤, 以无菌水为对照。接种后将其置于温室内, 塑料袋保湿 48 h 后揭去, 置于室内(25 $\pm$ 2) °C, 无伤接种组不进行刺伤, 其余同刺伤处理, 每处理 20 株, 隔日观察并记录。若植株萎蔫状叶片达到 2 片及以上、根部维管束变色, 则视为发病, 统计发病率, 并从发病部位再分离病原菌。

### 1.3 真菌表达载体转化农杆菌

**1.3.1 大肠杆菌的转化与质粒的提取** 取 100  $\mu$ L 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 加入 10  $\mu$ L 质粒混匀, 冰浴 30 min, 于 42 °C 水浴锅中热激 45 s, 冰浴 2 min。加入 500  $\mu$ L 肉汤培养基(luria-Bertani, LB, 成分:蛋白胨 10 g, 酵母膏粉 5 g, 氯化钠 5 g, 葡萄糖 1 g, 水 1000 mL), 37 °C, 200 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 1 h, 取 30  $\mu$ L 菌液涂布于 LB 平板(含 50  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> Kan), 37 °C 培养 12 h。挑取单克隆菌落混于 10  $\mu$ L 无菌水中, 作为模板 DNA, PCR 扩增 *EGFP* 基因片段进行阳性鉴定。PCR 体系(25  $\mu$ L):ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L, 2 $\times$ Mix 12.5  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 上下游引物(EGFP-F: ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG; EGFP-R: CTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG)各 1  $\mu$ L。扩增反

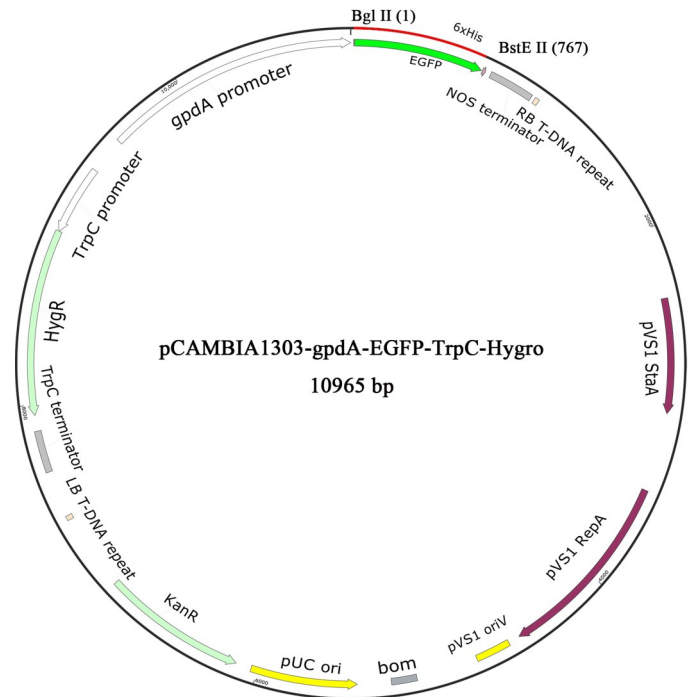


图 1 pCAMBIA1303-gpdA-EGFP-TrpC-Hygro 载体图谱

Fig. 1 Restriction map of vector pCAMBIA1303-gpdA-EGFP-TrpC-Hygro

应条件:94℃预变性10 min,94℃变性40 s,59℃退火40 s,72℃延伸40 s,35个循环,72℃复性10 min。将经验证的单克隆菌液接种于LB培养液(含50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Kan)中,37℃,220  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养12 h,提取质粒,置于-20℃备用。

**1.3.2 农杆菌的转化** 在100  $\mu\text{L}$ 农杆菌感受态LBA4404中加入10  $\mu\text{L}$ 质粒,依次冰浴、液氮、37℃水浴、再冰浴,各5 min,加入700  $\mu\text{L}$  LB培养液,于28℃、180  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养2.5 h,吸取30  $\mu\text{L}$ 菌液涂布于LB平板(含50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Kan和25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Rif),28℃培养48 h。挑取单克隆农杆菌进行阳性鉴定<sup>[25]</sup>,PCR反应体系和程序同1.3.1。

#### 1.4 党参黄芯病菌对HygB的敏感度测定

将分离纯化并保存的党参黄芯病菌DSHX2作为野生型菌株,于PDA活化7 d后接种于PDA平板(含HygB 0、25、50、100、150和200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),每个浓度重复3次,25℃培养7 d,观察并记录不同浓度的HygB平板上DSHX2生长情况,确定HygB的使用浓度。

#### 1.5 头孢噻肟钠对转入载体的农杆菌抑制程度的测定

将鉴定为阳性的农杆菌接种于LB培养液(含50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Kan和25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Rif),28℃、220  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养24 h,使菌液OD<sub>600</sub>值达到0.6,取50  $\mu\text{L}$ 分别涂布于头孢噻肟钠浓度为0、25、50、100、150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的LB平板,重复3次,28℃培养48 h,观察阳性农杆菌生长情况,确定头孢噻肟钠的最佳浓度。

#### 1.6 DSHX2的绿色荧光蛋白基因转化

将农杆菌阳性转化子接种于LB培养液(含50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Kan和25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Rif),于28℃、220  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养24 h,使菌液OD<sub>600</sub>达到0.6,6690  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,用1 mL诱导培养基[induction medium, IM,成分:K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 3.44 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.45 g、NaCl 0.15 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.50 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.50 g、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.067 g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0025 g、葡萄糖1.80 g、吗啉乙磺酸7.80 g、甘油5 mL,pH 5.4,水1000 mL]<sup>[26]</sup>洗涤2次,加入10 mL IM培养液(含200  $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$  AS),28℃、220  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养4~6 h至OD<sub>600</sub>达0.3。将100  $\mu\text{L}$  DSHX2孢子悬浮液(1×10<sup>6</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>)和100  $\mu\text{L}$ 农杆菌菌液混匀后涂布于共培养培养基(co-culture medium, CM,成分:在IM诱导培养基中加入1.5%琼脂)的0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜上。30个重复,19℃暗培养48 h,将微孔滤膜转移至PDA筛选平板(含100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HygB和50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 头孢噻肟钠),25℃黑暗培养。用无菌刀将滤膜划成小片,将长出的单菌落转接于PDA复筛平板(含100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HygB)进行复筛。

#### 1.7 转化子的HygB抗性和绿色荧光稳定性测定

挑取复筛平板上的菌落菌丝在荧光共聚焦显微镜(奥林巴斯FV3000,日本)下确认其在蓝光激发下展现绿色荧光,将荧光阳性转化子于常规PDA平板上连续培养5代,再转移至含100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HygB的PDA平板以验证抗性稳定性。挑取可正常生长的转化株,制备菌丝体玻片,置于荧光显微镜下观察菌丝和孢子的荧光强度。

#### 1.8 转化子的验证

**1.8.1 转化子的EGFP基因验证** 以煮沸法<sup>[27]</sup>快速获得DSHX2及转化子模板DNA,进行EGFP基因PCR验证,PCR反应体系和程序同1.3.1。

**1.8.2 野生子与转化子生物学特性对比** 使用打孔器打取形态与DSHX2相似的转化子菌饼(d=4 mm),接种于pH分别为5、6、7、8、9、10的PDA平板上,3次重复,25℃培养7 d,交叉交叉法测量菌落生长速度,描述菌落形态,测定野生子与转化子在菌落形态、生长速度上的差异,确定pH对野生子与转化子的影响。

**1.8.3 转化子致病性测定** 将野生型菌株DSHX2与转化子进行致病性测定,方法同1.2.4,根据发病速度和发病率,评估野生子与转化子的致病力差异。

#### 1.9 数据处理

使用Excel 2019和SPSS 25.0软件进行试验数据统计分析,最小显著性差数法(least significant difference, LSD)进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 党参黄芯病

**2.1.1 症状** 发病初期,植株地上部分1~2枝分支及叶片萎蔫下垂,其余分支正常生长,主根维管束变黄褐色;后期地上部分全部干枯,主根维管束呈红褐色,植株死亡。病原菌在土壤或带菌参根上越冬,上年已感染的参根在5月中下旬发病,6~7月为发病高峰期,发病率达20%~30%。从地上显症到全株死亡所需时间较短,当年的参根发病较晚,6月中下旬出现症状,8月达到高峰期。该病害在甘肃省党参种植区普遍发生,对党参生产构成严重威胁(图2)。

**2.1.2 病原** 在渭源县会川镇和陇西县首阳镇大田共采集党参黄芯病典型标样20份,通过组织分离,获得1株病原菌,命名为DSHX2,分离频率100%。在PDA上,该菌菌落呈絮状,菌丝致密,由内到外呈淡紫红色至白色,培养基背面淡黄色;CLA上,菌落由内向外为紫色至白色,菌丝稀疏,培养基背面中央紫色,外围白色;SNA上,菌落白色致密,中央稍显紫色,培养基背面色。该菌大型分生孢子镰刀状、马特形,两端渐细,顶细胞钝至乳突,弯曲,有足细胞,隔膜数1~4,一个隔膜的孢子大小为(16.1~24.7)  $\mu\text{m}$   $\times$  (3.0~4.6)  $\mu\text{m}$ ,平均(20.0 $\times$ 4.0)  $\mu\text{m}$ ;两个隔膜的孢子大小为(23.3~28.3)  $\mu\text{m}$   $\times$  (3.7~4.0)  $\mu\text{m}$ ,平均(25.2 $\times$ 4.0)  $\mu\text{m}$ ;3个隔膜的孢子大小为(24.1~43.1)  $\mu\text{m}$   $\times$  (3.9~5.9)  $\mu\text{m}$ ,平均(33.1 $\times$ 4.7)  $\mu\text{m}$ ;4个隔膜的孢子大小为(42.5~46.1)  $\mu\text{m}$   $\times$  (4.8~5.0)  $\mu\text{m}$ ,平均(44.3 $\times$ 4.9)  $\mu\text{m}$ 。小型分生孢子椭圆形、卵形、肾形,具0~1个隔膜,无隔膜的孢子大小为(7.4~7.7)  $\mu\text{m}$   $\times$  (2.5~2.8)  $\mu\text{m}$ ,平均(8.1 $\times$ 2.7)  $\mu\text{m}$ ;一个隔膜的孢子大小为(10.8~11.6)  $\mu\text{m}$   $\times$  (2.6~2.9)  $\mu\text{m}$ ,平均(11.1 $\times$ 2.7)  $\mu\text{m}$ ;产孢梗为单瓶梗;厚垣孢子单生圆形、椭圆形,串生(图3)。

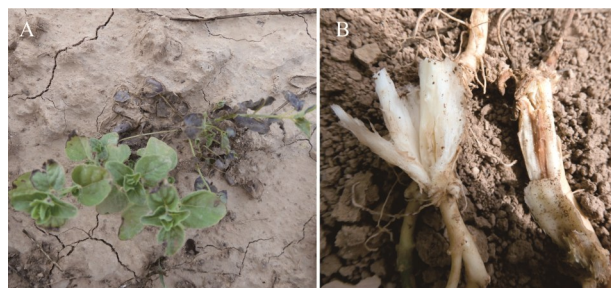


图2 党参黄芯病症状

Fig. 2 Symptoms of *C. pilosula* yellow-core disease

A: 地上部分 Aboveground part; B: 地下部分 Underground parts.

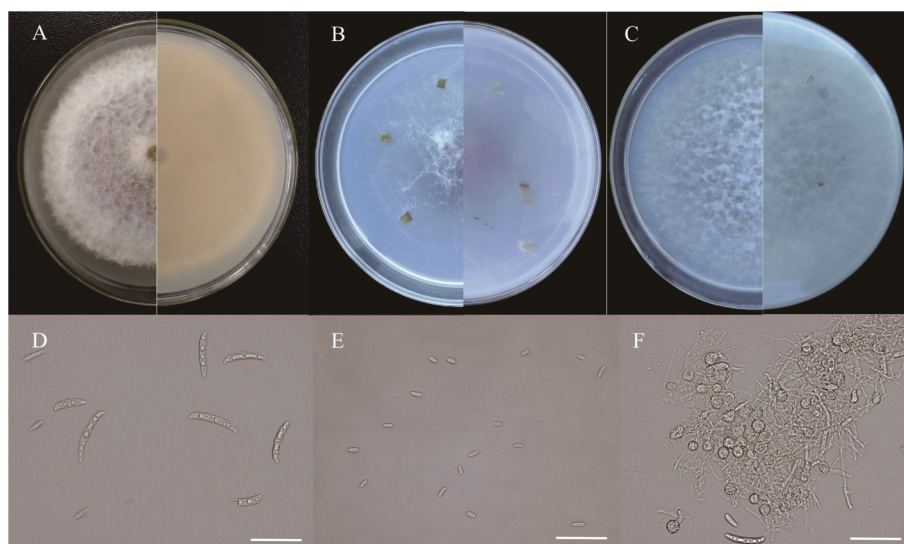


图3 DSHX2显微形态

Fig. 3 Morphology of DSHX2

A~C: PDA、CLA 和 SNA 上菌落形态 Colonies on PDA, CLA and SNA media; D: 大型分生孢子 Macroconidia; E: 小型分生孢子 Microconidia; F: 厚垣孢子 Chlamydospores (标尺 Scale bar=25  $\mu\text{m}$ ).

**2.1.3 分子生物学鉴定** 对 *EF-1 $\alpha$* 、*RPB1*、*RPB2* 片段成功扩增并获得长度分别为 685、1499 和 925 bp 的序列,将序列上传至 GenBank 获得登录号为 PP885712~PP885714。经 BLAST 比对,3 个片段与 *Fusarium*

*curvatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp. 多个菌株相似性均在 99% 以上。将 *EF-1 $\alpha$* 、*RPB1*、*RPB2* 这 3 个片段联合构建系统发育树,结果如图 4 所示,分离株 DSHX2 与 *F. curvatum* 的模式菌株 CBS 23894<sup>T</sup> 聚在同一分支。

查阅资料,DSHX2 与 *F. curvatum* 菌落形态相似,在 PDA 培养基上均呈淡葡萄酒色至淡玫瑰色。在显微形态上,DSHX2 与 *F. curvatum* 的孢子大小相近。DSHX2 大型分生孢子具 1~4 个隔膜,大小分别为 (20.0×4.0)  $\mu\text{m}$ 、(25.2×4.0)  $\mu\text{m}$ 、(33.1×4.7)  $\mu\text{m}$  和 (44.3×4.9)  $\mu\text{m}$ ,小型分生孢子具 0~1 隔膜,大小分别为 (8.1×2.7)  $\mu\text{m}$  和 (11.1×2.7)  $\mu\text{m}$ ;而 *F. curvatum* 大型分生孢子具 2~5 个隔膜,孢子大小分别为 (19.0×3.0)  $\mu\text{m}$ 、(33.0×4.0)  $\mu\text{m}$ 、(40.0×4.0)  $\mu\text{m}$  和 (42.0×4.0)  $\mu\text{m}$ ,小型分生孢子具 0~1 个隔膜,大小分别为 (7×3)  $\mu\text{m}$  和 (12×3)  $\mu\text{m}$ 。但是 *F. curvatum* 的大型分生孢子呈强烈弯曲,而 DSHX2 的大型分生孢子稍弯曲,并未观察到强烈弯曲的大型分生孢子。在系统发育树中,DSHX2 与 *F. curvatum* 聚类在一个分支,由于形态上有一定差异,因此,将党参黄芯病菌 DSHX2 鉴定为弯镰孢菌党参变种 (*F. curvatum* var. *codonopsidis*)。

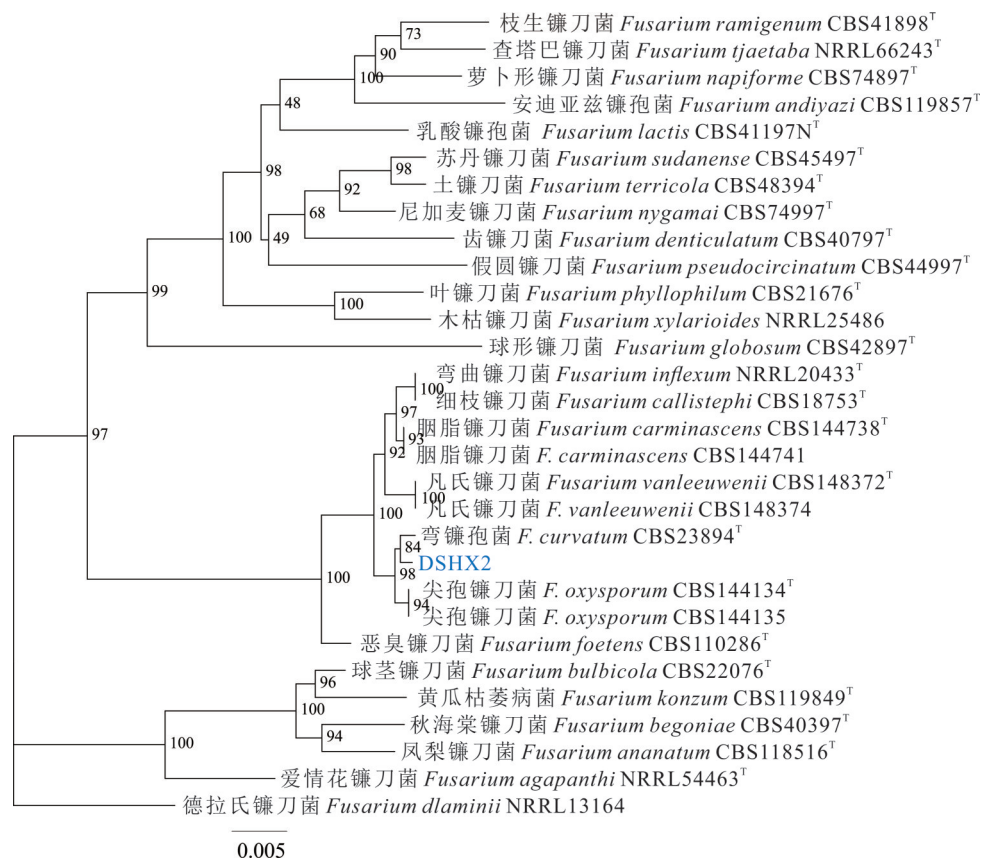


图 4 *F. curvatum* var. *codonopsidis* DSHX2 多基因联合系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *F. curvatum* var. *codonopsidis* DSHX2 based on multi-gene combination

**2.1.4 致病性测定** 如图 5 所示,接种病原菌的植株长势较对照组的植株缓慢,21 d 后,接种组植株地上部分 100% 出现萎蔫衰败(图 5A,B),无伤接种组 76.2% 的植株维管束呈黄棕色病变(图 5E),刺伤接种组 89.7% 的根部刺伤部位呈棕褐色腐烂,86% 的维管束发生病变(图 5F),无伤对照组的地上及地下部分均未发病(图 5C,G),刺伤对照组 5% 的根部刺伤部位产生浅棕色病变(图 5D,H)。从党参发病部位分离出的病原菌与 DSHX2 一致,表明 DSHX2 为党参黄芯病的致病菌。

## 2.2 真菌表达载体转化农杆菌

以转化后农杆菌质粒 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,引物为 EGFP-F/R。凝胶电泳结果显示获得一条 717 bp 的特异性条带(图 6),与目的片段 *EGFP* 大小一致,说明载体 pCAMBIA1303-gpdA-EGFP-TrpC-Hygro 已成功转化至农杆菌 LBA4404,同时获得了 11 株农杆菌阳性转化子。

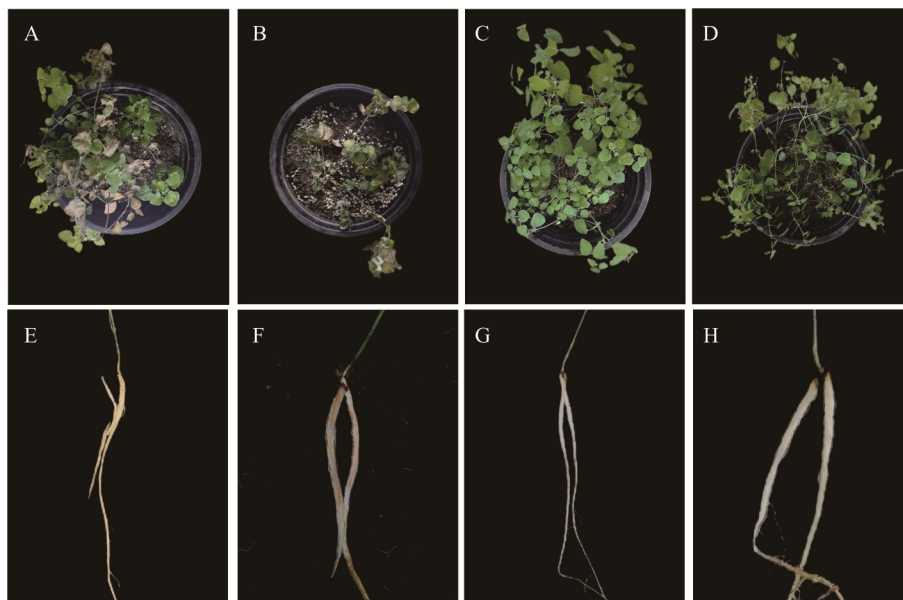


图5 接种黄芯病病原菌后党参根系的发病症状

Fig. 5 Symptoms in roots of *C. pilosula* after inoculation with yellow core disease pathogen

A, E: 无伤接种 Noninvasive inoculation; B, F: 刺伤接种 Stab inoculation; C, G: 无伤对照 Noninvasive blank control; D, H: 刺伤对照 Stab control.

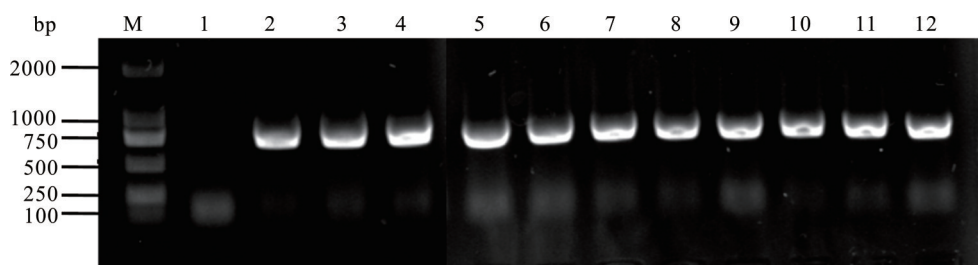


图6 阳性根癌农杆菌EGFP基因的PCR验证结果

Fig. 6 PCR verification results of the positive *A. tumefaciens* EGFP gene

M: Marker; 1: 蒸馏水, 阴性对照 Sterile water, negative control; 2: pCAMBIA1303-gpdA-EGFP-TrpC-Hygro, 阳性对照 Positive control; 3~12: EGFP农杆菌阳性转化子 Transformed *A. tumefaciens* strains harboring EGFP.

### 2.3 DSHX2对HygB的敏感度测定

DSHX2在含有不同浓度HygB的PDA平板上培养7 d,结果如图7所示,随着HygB浓度的增加,菌落生长愈缓慢。HygB浓度为 $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,DSHX2可正常生长,7 d后菌落直径为7.8 cm;浓度为 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,DSHX2生长受到抑制,菌落直径为1.6 cm;浓度 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,仅原菌饼周围有少许菌丝生长;HygB浓度至 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,菌落不生长。因此,确定筛选EGFP标记转化子菌株的最佳HygB浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

### 2.4 头孢噻肟钠抑制农杆菌生长浓度的测定

将阳性农杆菌菌株涂布于含不同浓度头孢噻肟钠的LB平板,培养48 h后,浓度为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的处理组无菌落出现,因此,筛选转化子时选择 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为农杆菌的抑菌浓度(表1)。

### 2.5 党参黄芯病菌的遗传转化

利用农杆菌介导法进行菌株DSHX2的EGFP基因转化,结果表明,在 $19^\circ\text{C}$ 共培养48 h后转接至筛选平板, $25^\circ\text{C}$ 培养72 h后,微孔滤膜上开始生长出菌落,用无菌刀将滤膜划成小块,并将单菌落摆放至复筛平板上,共有138个抗HygB转化子重新长出,将138个转化子依次命名为EGFP7-1,EGFP7-2,EGFP7-3, ..., EGFP7-138,转化效率约为 $46 \text{个转化子}\cdot 10^{-6} \text{个孢子}$ 。经荧光显微镜观察后,选取4株荧光较强的转化子EGFP7-1~EGFP7-4在PDA平板上转接5代,后转到含有 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ HygB的PDA平板上,均可正常生长,且绿色荧光仍较强,而野生

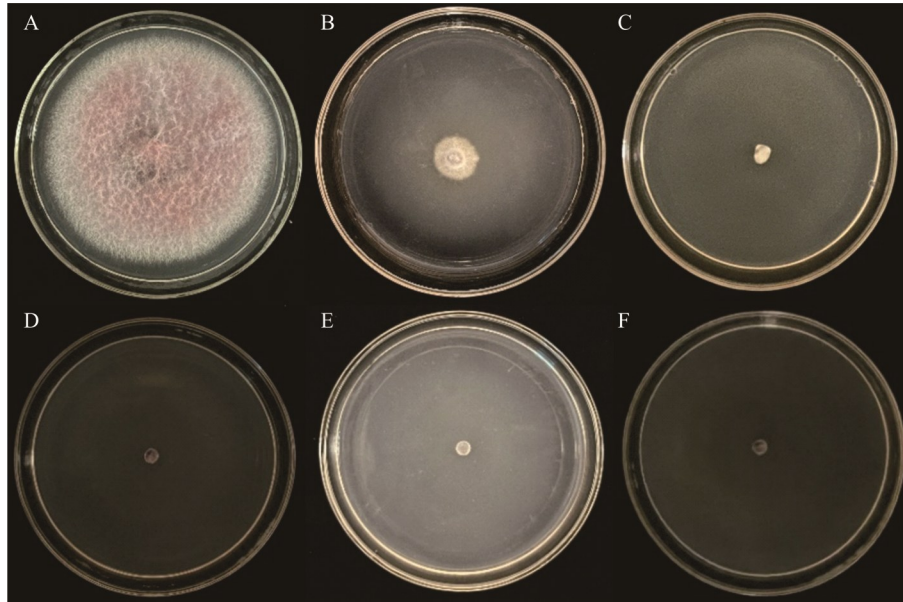


图 7 不同浓度 HygB 对 DSHX2 的生长抑制情况

Fig. 7 DSHX2 growth rate under different concentrations of hygromycin B

A:  $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HygB; B:  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HygB; C:  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HygB; D:  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HygB; E:  $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HygB; F:  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HygB.

表 1 农杆菌生长受头孢噻肟钠的抑制作用

Table 1 Agrobacterium growth rate under different concentrations of cefotaxime sodium

项目 Item	头孢噻肟钠浓度 Mass concentration of cefotaxime sodium				
	$0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
农杆菌生长状况 The growth state of LBA4404	++	+	-	-	-

++: 生长良好 Growth well; +: 微弱生长 Grows slowly; -: 完全不生长 Doesn't grow.

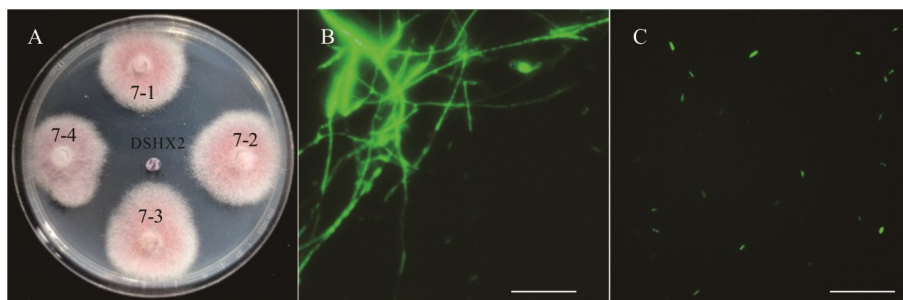


图 8 阳性转化子 HygB 稳定性和增强型绿色荧光表达

Fig. 8 Stability of hygromycin-resistant transformants and enhanced green fluorescent protein expression

A 为含有  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  HygB 的 PDA 平板上 4 株转化子和 DSHX2 Four transformants and DSHX2 grown on PDA supplemented with  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  hygromycin; B, C 分别为 4 号转化子 (EGFP7-4) 荧光显微镜蓝色激发光下菌丝和分生孢子 Mycelia and conidia of EGFP7-4, respectively, under blue excitation light microscopy (标尺 Scale bar= $50 \mu\text{m}$ ).

型菌株 DSHX2 完全被抑制, 不生长 (图 8A), 证实转化子 HygB 抗性和荧光能稳定遗传。转化子的菌丝和分生孢子与 DSHX2 一致, 且在蓝色激发光下发出明亮的绿色荧光 (图 8B, C)。

## 2.6 转化子验证

**2.6.1 转化子的绿色荧光蛋白基因验证** PCR 扩增随机挑选的 EGFP7-1~EGFP7-4 中的 *EGFP* 基因, 凝胶电泳得到 717 bp 的明亮条带, 与目的片段的条带一致, 说明 *EGFP* 基因已成功转入党参黄芯病菌, 而未进行

*EGFP*基因标记的野生型菌株DSHX2中未形成此条带(图9)。

**2.6.2 对比DSHX2与转化子生物学特性** 如图10所示,转化子EGFP7-3与EGFP7-4的菌落形态与野生型菌株DSHX2表现出高度相似性,菌丝均呈白色,菌落由内到外呈淡粉紫色到白色,菌丝致密,似毛毡状,转化子与野生型菌株DSHX2无明显差异。

图11计算可知,EGFP7-3、EGFP7-4和DSHX2在PDA平板上7d平均生长速度分别为 $(1.24 \pm 0.30) \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $(1.25 \pm 0.29) \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $(1.23 \pm 0.36) \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ ,转化子EGFP7-3、EGFP7-4菌丝生长速度与野生型菌株DSHX2差异不显著( $P > 0.05$ )。

如图12所示,EGFP7-3、EGFP7-4和DSHX2均可在pH为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0的PDA平板中生长,经7d培养,测得各菌株在pH=8时菌落直径最大,分别为 $(7.73 \pm 0.89) \text{ cm}$ 、 $(7.67 \pm 0.86) \text{ cm}$ 、 $(7.75 \pm 0.76) \text{ cm}$ ,显著高于其他pH条件下的测量结果( $P < 0.05$ ),表明pH=8为最适宜pH。3株菌在不同pH条件下生长状态差异不明显,其生长速度趋势都为先升高后降低,且各菌株在同样pH培养7d条件下生长速度基本一致,无明显差异。总之,含*EGFP*和*HygB*抗性基因二元载体的T-DNA随机插入不会影响党参黄苕病菌的菌落形态及正常生长速度。

**2.6.3 转化子致病性测定** 将野生型菌株DSHX2和转化子EGFP7-3、EGFP7-4接种至党参14d后,党参植株叶片均开始萎蔫;21d后,地上部分大量叶片明显出现萎蔫、青枯,似缺水状;发病植株根部干枯皱缩,维管束黄褐色,严重者根部为褐色腐烂状,整株死亡。各处理组发病率分别为75%、80%、75%,对照组植株生长正常,无症状(图13)。通过组织分离法,从发病植株中重新分离出的病原菌与原接种菌株一致,表明*EGFP*的转化和表达对病原菌的致病力无明显影响。

### 3 讨论

近年来,Geiser等<sup>[28]</sup>基于分子系统发育分析的分类方法,重新定义镰刀菌属(*Fusarium*)的概念,镰刀菌属目前包括23个单系复合种和400余个系统发育上可区分的物种。*F. oxysporum* species complex (FOSC)是其中一个单系复合种,该复合种中的成员是引起植物枯萎病、根腐病和鳞茎腐烂病<sup>[29-33]</sup>的病原菌,因此受到广泛关注。识别镰刀菌的种类对于诊断和防治相关病害至关重要,目前的分类方法依赖于形态特征和分子系统发育分析相结合的方式。在区分具有细微形态差异的镰刀菌物种时,多基因串联系统发育分析能提供分子理论支持,从而准确区分FOSC中各个种。Li等<sup>[34]</sup>利用*tef1-CaM-rpb2*多基因串联分析,将梨树(*Pyrus* spp.)枯萎病菌鉴定为FOSC

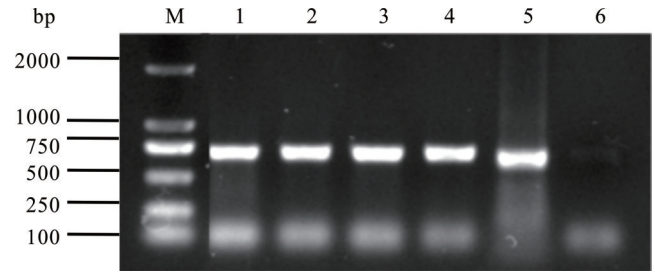


图9 转化子*EGFP*基因PCR验证

**Fig. 9 PCR verification of *EGFP* gene of the transformants**

M: DNA Marker; 1~4: 转化子EGFP7-1~EGFP7-4 Transformants EGFP7-1-EGFP7-4; 5: pCAMBIA1303-gpdA-EGFP-TrpC-Hygro, 阳性对照 Positive control; 6: DSHX2, 阴性对照 Negative control.

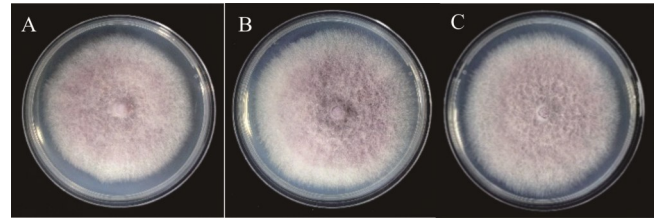


图10 DSHX2与阳性转化子的菌落形态

**Fig. 10 The colony morphology of DSHX2 and positive transformants of *F. curvatum* var. *codonopsisidis***

A: DSHX2; 野生型菌株 The wild type strain; B, C: EGFP7-3、EGFP7-4, 阳性转化子 Positive transformants.

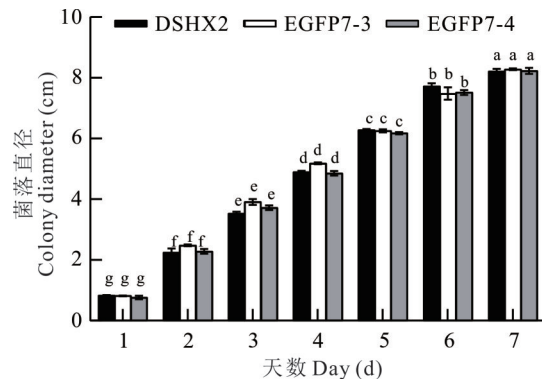


图11 野生子与转化子在PDA平板上的菌落直径

**Fig. 11 Colony diameter of wild-type and positive transformants on PDA**

不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。Different lowercase letters mean significant difference at  $P < 0.05$  level.

的 *Fusarium cugenangense*。本研究对甘肃党参主产区党参黄芯病发生情况进行了田间调查并分离获得了该病的病原菌 DSHX2, 基于形态学与 *EF1- $\alpha$ -RPB1-RPB2* 多基因联合构建系统发育树分析, DSHX2 与 FO5C 的 *F. curvatum* 聚到同一分支, 并且菌落形态特征相似, 分生孢子大小接近, 表明它们具有较近的亲缘关系, 但是 *F. curvatum* 的大型分生孢子呈强烈弯曲, 而 DSHX2 的大型分生孢子稍弯曲, 显微形态存在区别。根据国际藻类、菌物和植物命名法规 (international code of nomenclature, ICN)<sup>[36]</sup>, 提出将党参黄芯病菌 DSHX2 鉴定为弯镰孢 (*F. curvatum*) 的

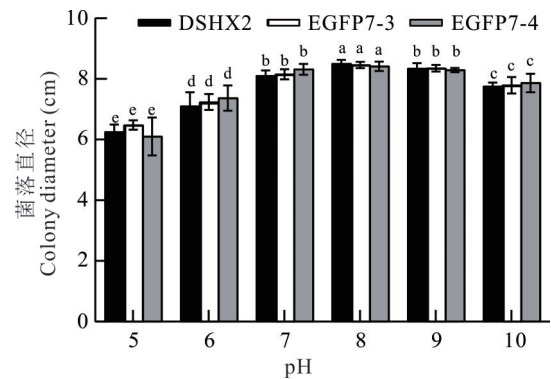


图 12 pH 对野生子与转化子生长的影响

Fig. 12 The growth of wild-type and transformants under different pH



图 13 转化子 EGFP7-3 和 EGFP7-4 与野生子 DSHX2 致病性测定

Fig. 13 Pathogenicity test of transformants EGFP7-3, EGFP7-4 and DSHX2

A, E: EGFP7-3; B, F: EGFP7-4; C, G: DSHX2; D, H: 无菌水 Sterile water.

一个党参变种, 命名为 *F. curvatum* var. *codonopsidis*。

丝状真菌遗传转化技术主要包括农杆菌转化法、电穿孔转化法和聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 介导的原生质体转化法等<sup>[25, 37-39]</sup>。本研究选用的农杆菌转化法具有高效性、高稳定性和单拷贝插入的精确性, 广泛应用于真菌的遗传转化。GFP 标记是研究病原菌与寄主植物互作的良好可视化工具, 而野生型 GFP 存在局限性, 如双激发峰导致检测特异性和长波激发效率欠佳, 影响观测效果。EGFP 作为 GFP 的优化突变体, 有效克服了这些缺陷, 且 EGFP 荧光强度是野生型的 35 倍, 提升了观测便利性和准确性<sup>[40]</sup>, 因此本研究选用 EGFP 作为报告基因。目前, 潮霉素 B、博来霉素、寡霉素等选择标记常被用于真菌遗传转化, 使转化子在一定浓度表现抗药性, 从而筛选转化子<sup>[41]</sup>。本研究选用 *HygB* 作为抗性筛选标记, 通过测试揭示党参黄芯病菌对 *HygB* 的敏感性, 结果显示在  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度下党参黄芯病菌的生长受到显著抑制, 因此该浓度被用于转化过程中筛选转化子。

本研究采用农杆菌转化法成功获得党参弯镰孢的 EGFP 标记菌株, 共获得 138 株阳性转化子, 转化效率约为  $46 \text{ 个转化子}\cdot 10^{-6} \text{ 个孢子}$ ; 陈燕萍等<sup>[17]</sup> 报告的苦瓜 (*Momordica charantia*) 枯萎病菌转化效率为  $14.5 \text{ 个转化子}\cdot 10^{-6} \text{ 个孢子}$ ; 任俊杰等<sup>[42]</sup> 转化西瓜 (*Citrullus lanatus*) 枯萎病菌的效率为  $11.7 \text{ 个转化子}\cdot 10^{-6} \text{ 个孢子}$ ; 刘叶等<sup>[43]</sup> 通

过优化,将棉花(*Gossypium hirsutum*)枯萎病菌的转化效率提升到 $(252.00 \pm 7.37)$ 个 $\cdot 10^{-5}$ 个孢子。相较之下,本研究的转化效率稍低,可以通过调整农杆菌株的选择、农杆菌浓度、真菌孢子浓度、两者比例、共培养时间和温度、乙酰丁香酮浓度等条件以构建党参黄芯病菌高效转化体系<sup>[44-45]</sup>。本研究随机选取的4株转化子在传代培养6次后,依然在蓝色激发光下发出稳定的强绿色荧光,并且用EGFP特异性引物PCR可扩增出预期大小的谱带,这表明EGFP基因已成功整合入党参黄芯病原菌基因组,并实现了稳定遗传与高效表达。已有研究表明,农杆菌介导转化过程中,T-DNA在真菌基因组中的插入位置具有随机性,这一特性可能影响到转化子的菌落形态、颜色、增殖速度以及生理特性等变化<sup>[46]</sup>。EGFP标记菌EGFP7-3与EGFP7-4生长正常,菌落形态、生长速度、pH对生长速度的影响以及致病性和野生株无明显差别,陈燕萍等<sup>[17]</sup>、姚锦爱等<sup>[47]</sup>的研究也报告了类似的生物学特性。

在病原菌-植物互作研究中,常将荧光标记的病原菌用于病原菌侵染途径的可视化观察<sup>[48]</sup>。植物富含的叶绿素和木质素会发出波长范围很广的荧光<sup>[49]</sup>,因此,在荧光显微镜下,植物组织的自发荧光可能会干扰荧光染色和荧光蛋白的特异性检测。共聚焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)图像可以包含多个不同的通道,每个通道都是特定波长范围内光子的集合,适当的设置可以避免其他通道的荧光泄漏干扰。本研究在奥林巴斯FV3000共聚焦显微镜下观察EGFP标记菌株侵染党参过程时,即使设置窄波长窗口,优化荧光信号的采集,党参自发荧光的干扰仍然不可避免,难以区分EGFP标记的病原菌与植物自发荧光背景。目前,荧光寿命成像(fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM)和高分辨率三维成像被用来区分荧光和自发荧光背景,但它们通常用来解决特定的试验问题,如蛋白质相互作用或构象变化研究<sup>[50-51]</sup>。本研究下一步或将参考Jiang等<sup>[52]</sup>开发的消除图像中植物自发荧光干扰的方法,观察病原菌侵染党参过程。

#### 4 结论

本研究通过对甘肃省陇西县首阳镇、渭源县会川镇党参黄芯病的调查研究,确定了党参黄芯病的病原菌为*F. curvatum*的一个新变种,命名为*F. curvatum* var. *codonopsidis*。EGFP标记菌株EGFP7-3与EGFP7-4可用于研究党参黄芯病菌对党参的侵染过程,为下一步开展党参黄芯病菌的致病机理、防治技术等研究提供了良好的材料。同时,本研究建立的农杆菌介导的党参黄芯病菌遗传转化体系,为后期研究党参及其病原菌之间的互作机制提供了有效技术手段。

#### 参考文献 References:

- [1] State Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China Pharmacopoeia (one). Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 342.  
国家药典委员会. 中国药典(一部). 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 342.
- [2] Li F, Yang F D. Research progress on extraction and isolation, chemical compound and pharmacological effects of polysaccharide from Dangshen (*Codonopsis Radix*). Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2023, 41(4): 42-49.  
李芳, 杨扶德. 党参多糖提取分离、化学组成和药理作用研究进展. 中华中医药学刊, 2023, 41(4): 42-49.
- [3] Li C, Zhang H, Peng L, et al. Study of volatile chemical components in *Codonopsis pilosula*. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 1993, 15(S2): 86-90.  
李聪, 张红, 彭莉, 等. 党参中挥发性化学成分的研究. 云南大学学报(自然科学版), 1993, 15(S2): 86-90.
- [4] Chen J Y, Liu Z G, Liu Q L, et al. Ozone application suppressed the blue mold development and maintained the main active ingredients content of postharvest fresh *Codonopsis pilosula* during storage. Journal of Fungi, 2024, 10(3): 163.
- [5] Zhao X, Liang Y, Constantine U, et al. First report of root rot caused by the *Fusarium oxysporum* species complex on *Codonopsis pilosula* in China. Plant Disease, 2021, (2021-06-02)[2025-03-03]. Doi: 10.1094/PDIS-02-21-0418-PDN.
- [6] Yu Z L, Lei M Y, Pu S C, et al. Fungal disease survey and pathogen identification on *Codonopsis tangshen* in Chongqing. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2015, 38(6): 1119-1122.  
余中莲, 雷美艳, 蒲盛才, 等. 重庆党参真菌病害种类调查及病原鉴定. 中药材, 2015, 38(6): 1119-1122.
- [7] Chen S Z. Survey and control on grey mould in *Codonopsis pilosula* in Dingxi of Gansu Province. Grassland and Turf, 2017, 37(2): 94-97.  
陈书珍. 甘肃省定西党参灰霉病调查及田间药剂防治. 草原与草坪, 2017, 37(2): 94-97.

- [8] Wang Y, Zeng C Y, Chen H G, *et al.* Pathogen identification and cultural characteristics of leaf spot of *Codonopsis pilosula*. *Journal of Plant Protection*, 2016, 43(6): 928–934.  
王艳, 曾翠云, 陈红刚, 等. 党参斑枯病病原菌及其生物学特性. *植物保护学报*, 2016, 43(6): 928–934.
- [9] Sun X R, Zhong C P, Zhang X M, *et al.* Identification and control of the root rot pathogen of *Codonopsis pilosula* in Dingxi of Gansu Province. *Plant Protection*, 2020, 46(5): 290–297.  
孙新荣, 仲彩萍, 张西梅, 等. 甘肃定西地区党参根腐病病原鉴定与防治研究. *植物保护*, 2020, 46(5): 290–297.
- [10] Wang Y, Chen X R, Wang Y Q, *et al.* Disease survey and pathogen identification on *Codonopsis pilosula* in Gansu Province. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2011, 39(8): 866–868, 871.  
王艳, 陈秀蓉, 王引权, 等. 甘肃省党参病害种类调查及病原鉴定. *山西农业科学*, 2011, 39(8): 866–868, 871.
- [11] Zou R, Ma J N, Zhang F. Research progress on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system of mycorrhizal fungi. *Journal of Fungal Research*, 2021, 19(3): 197–206.  
邹嵘, 马嘉楠, 张凤. 根瘤农杆菌介导的菌根真菌遗传转化研究进展. *菌物研究*, 2021, 19(3): 197–206.
- [12] Walter I, Fleischmann M, Klein D, *et al.* Rapid and sensitive detection of enhanced green fluorescent protein expression in paraffin sections by confocal laser scanning microscopy. *The Histochemical Journal*, 2000, 32(2): 99–103.
- [13] Jiang M, Lv J X, Huang Y L, *et al.* Applications of green fluorescent protein in plant pathology. *Plant Protection*, 2011, 37(5): 39–43.  
蒋明, 吕枷薪, 黄余磊, 等. 绿色荧光蛋白在植物病理学中的应用. *植物保护*, 2011, 37(5): 39–43.
- [14] Yoon J H, Kim Y J, Kim S Y, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the aquatic fungus *Phialemonium inflatum* FBCC-F1546. *Journal of Fungi*, 2023, 9(12): 1158.
- [15] Henares B M, Debler J W, Farfan-Caceres L M, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and expression of GFP in *Ascochyta lentis* to characterize ascochyta blight disease progression in lentil. *PLoS One*, 2019, 14(10): e0223419.
- [16] Sarrocco S, Falasvhi N, Vergara M, *et al.* Use of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* transformed with marker genes to follow colonization of carnation roots. *Journal of Plant Pathology*, 2007, 89(1): 47–54.
- [17] Chen Y P, Liu X, Xiao R F, *et al.* Transformation of green fluorescent protein of *Fusarium oxysporum* isolated from diseased bitter melon. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 35(11): 1228–1233.  
陈燕萍, 刘欣, 肖荣凤, 等. 苦瓜枯萎病原菌的绿色荧光蛋白基因标记. *福建农业学报*, 2020, 35(11): 1228–1233.
- [18] Liu X Y, Luo Z P, Cui W K, *et al.* Histological observation of the infection process in *Rehmannia glutinosa* by *Fusarium oxysporum* labeled with green fluorescent protein (GFP) gene. *Mycosystema*, 2015, 34(6): 1092–1100.  
刘晓燕, 罗振鹏, 崔伟康, 等. 绿色荧光蛋白标记下镰刀菌侵染地黄的组织学观察. *菌物学报*, 2015, 34(6): 1092–1100.
- [19] Liu Y, Gu A X, Zhu Q. Construction and analysis of mutant library of cotton *Fusarium wilt*. *Microbiology China*, 2022, 49(1): 125–138.  
刘叶, 顾爱星, 朱琦. 棉花枯萎病菌突变体库的构建及分析. *微生物学通报*, 2022, 49(1): 125–138.
- [20] Zhang X. Studies on genetic diversity and transformation of the green fluorescent protein gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, causal agent of banana *Fusarium wilt*. Danzhou: South China Agricultural University, 2007.  
张欣. 香蕉枯萎病菌遗传多态性及绿色荧光蛋白基因转化的研究. 儋州: 华南热带农业大学, 2007.
- [21] Zhang T, Wang Y, Jin L, *et al.* Biological characteristics and indoor toxicity test of main pathogens of Chinese angelica (*Angelica sinensis*) root rot. *Journal of Microbiology*, 2024, 44(2): 71–78.  
张婷, 王艳, 晋玲, 等. 当归根腐病主要病原菌生物学特性及室内毒力测定. *微生物学杂志*, 2024, 44(2): 71–78.
- [22] Donnell K O, Kistler H C, Cigelnik E, *et al.* Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(5): 2044–2049.
- [23] Hofstetter V, Miadlikowska J, Kauff F, *et al.* Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: a case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44(1): 412–426.
- [24] Reeb V, Lutzoni F, Roux C. Contribution of *RPB2* to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 32(3): 1036–1060.
- [25] Zhou X F, Zhao J, Zhao H, *et al.* A rapid identification method of recombinant *Agrobacterium* PCR reaction. *Journal of Jilin Normal University (Natural Science Edition)*, 2015, 36(2): 109–111.

- 周晓馥, 赵晶, 赵航, 等. 一种快速的重组农杆菌PCR鉴定方法. 吉林师范大学学报(自然科学版), 2015, 36(2): 109–111.
- [26] Dong Y, Wang S T. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method for *Fusarium oxysporum*. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2391: 63–73.
- [27] Luo Z Q, Cheng L, Zhang X, *et al.* A rapid method of preparing DNA template of filamentous fungi for PCR amplification. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(9): 79–83.  
罗中钦, 程琳, 张茜, 等. 丝状真菌PCR模板DNA的快速制备方法. 生物技术通报, 2015, 31(9): 79–83.
- [28] Geiser D M, Al-Hatmi A M S, Aoki T, *et al.* Phylogenomic analysis of a 55.1-kb 19-gene dataset resolves a monophyletic *Fusarium* that includes the *Fusarium solani* species complex. *Phytopathology*, 2021, 111(7): 1074–1079.
- [29] Nikitin D A, Ivanova E A, Semenov M V, *et al.* Diversity, ecological characteristics and identification of some problematic phytopathogenic *Fusarium* in soil: a review. *Diversity*, 2023, 15(1): 49.
- [30] Akgül D S, Önder S, Savaş N G, *et al.* Molecular identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with wood canker, root and basal rot in turkish grapevine nurseries. *Journal of Fungi*, 2024, 10(7): 444.
- [31] Fang D Z, Liu X L, Chen X R, *et al.* *Fusarium* species and *Fusarium oxysporum* species complex genotypes associated with yam wilt in south-central China. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 17(11): 1964.
- [32] Mirghasempour S A, Michailides T, Chen W, *et al.* *Fusarium* spp. associated with dendrobium officinale dieback disease in China. *Journal of Fungi*, 2022, 8(9): 919.
- [33] Zhou Y Y, Zhang W, Li X H, *et al.* *Fusarium* species associated with cherry leaf spot in China. *Plants*, 2022, 11(20): 2760.
- [34] Li C H, Li X G, Sun W B, *et al.* Identification of *Fusarium cugenangense* as a causal agent of wilt disease on *Pyrus pyrifolia* in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 2024, (2024-02-29)[2025-03-03]. Doi: 10.1016/j.jia.2024.02.018.
- [35] Lombard L, Sandoval-Denis M, Lamprecht S C, *et al.* Epitypification of *Fusarium oxysporum*-clearing the taxonomic chaos. *Persoonia*, 2019, 43: 1–47.
- [36] Turland N J, Wiersema J H, Barrie F R, *et al.* International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen code). Glashütten, Germany: Koeltz Botanical Books, 2018.
- [37] Chakraborty B N, Patterson N A, Kapoor M. An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 1991, 37(11): 858–863.
- [38] DeGroot M J, Bundock P, Hooykaas P J, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(9): 839–842.
- [39] Li D D, Tang Y, Lin J, *et al.* Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 168.
- [40] Song C L, Li L J, Wen J Z. Construction of vector for genetic transformation of *Phytophthora sojae*. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2009, 40(1): 9–12.  
宋传玲, 李丽珺, 文景芝. 大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)增强型绿色荧光蛋白遗传转化载体的构建. 东北农业大学学报, 2009, 40(1): 9–12.
- [41] Deng D J, Meng Y N, Deng E J, *et al.* Application of genetic selection system in filamentous fungi: a review. *Microbiology China*, 2019, 46(5): 1165–1178.  
邓大杰, 孟亚南, 邓二杰, 等. 丝状真菌遗传筛选系统的研究及其应用. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1165–1178.
- [42] Ren J J, Wang L X, Gao H B, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Plant Protection*, 2015, 41(1): 93–97.  
任俊杰, 王丽霞, 高洪波, 等. 农杆菌介导的西瓜枯萎病菌遗传转化. 植物保护, 2015, 41(1): 93–97.
- [43] Liu Y, Ayibaota·Tuohedabai, Guo N N, *et al.* Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for *Fusarium oxysporum*. *Microbiology China*, 2021, 48(9): 2991–3001.  
刘叶, 阿依保他·托合达白, 郭楠楠, 等. 农杆菌介导的棉花枯萎病菌转化体系的优化. 微生物学通报, 2021, 48(9): 2991–3001.
- [44] Dong Y H, Wang S T. *Fusarium* wilt: Methods and protocols. New York: Springer US, 2022: 63–73.
- [45] Liu Y Q, Li C, Xu X D, *et al.* Marking of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* with green fluorescent protein (GFP) and measurement of its stability. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2013, 35(1): 15–18.  
刘勇勤, 李赤, 徐秀德, 等. 利用绿色荧光蛋白(GFP)标记香蕉枯萎病菌及其稳定性检测. 吉林农业大学学报, 2013, 35(1): 15–18.
- [46] Fan L, Zhang J, Yang L, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Botrytis cinerea* strain RoseBc-3.

Journal of Huazhong Agricultural University, 2013, 32(2): 30–35.

范雷, 张静, 杨龙, 等. 农杆菌介导灰葡萄孢菌株 RoseBc-3 的遗传转化. 华中农业大学学报, 2013, 32(2): 30–35.

- [47] Yao J A, Zhang H, Huang P, *et al.* Green fluorescent protein genetic marker of *Fusarium oxysporum* F-02 of stem rot disease on *Cymbidium ensifolium*. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2019, 34(1): 70–75.  
姚锦爱, 张鸿, 黄鹏, 等. 建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌 F-02 的绿色荧光蛋白基因标记. 福建农业学报, 2019, 34(1): 70–75.
- [48] Zhang Y, Zhang J, Gao J, *et al.* The colonization process of sunflower by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae* and its seed transmission. Plant Disease, 2018, 102(9): 1772–1778.
- [49] García-Plazaola J I, Fernández-Marín B, Duke S O, *et al.* Autofluorescence: biological functions and technical applications. Plant Science, 2015, 236: 136–145.
- [50] Dumur T, Duncan S, Graumann K, *et al.* Probing the 3D architecture of the plant nucleus with microscopy approaches: challenges and solutions. Nucleus, 2019, 10(1): 181–212.
- [51] Kodama Y. Time gating of chloroplast autofluorescence allows clearer fluorescence imaging in planta. PLoS One, 2016, 11(3): Doi: 10.1371/journal.pone.0152484.
- [52] Jiang X, Pees T, Reinhold-Hurek B. Deep-learning-based removal of autofluorescence and fluorescence quantification in plant-colonizing bacteria *in vivo*. New Phytologist, 2022, 235(6): 2481–2495.