

小麦赤霉菌绿色荧光蛋白标记突变体的侵染研究

张旭¹, Theo van de Lee², 陆维忠¹, 喻大昭³, 马鸿翔¹

(¹江苏省农业科学院农业生物技术研究所, 南京 210014, 中国; ²Plant Research International, Wageningen, 6700 AA, 荷兰;

³湖北省农业科学院植保土肥研究所, 武汉 430064, 中国)

摘要: 【目的】赤霉病是危害大麦、小麦生产的世界性病害, 研究病原菌的致病过程对于病害的控制有重要意义。【方法】本研究利用绿色荧光蛋白(GFP)标记的禾谷镰刀菌回复突变体以单花滴注方法进行人工接种研究不同突变体的致病力差异及其在小麦穗部的侵染过程。【结果】269株回复突变体的致病力存在明显分化。接种6d后, 致病力明显降低的突变体, 只有接种小穗发病, 致病力明显增强的突变体, 病症可扩展至5个小穗。GFP荧光信号检测表明, 弱致病突变体在接种后仅在接种小穗内生长、延伸, 并终止于小穗基部的致密组织处。而强致病力突变体在接种小穗内生长2d后, 即能够通过小穗基部的致密组织到达小麦穗轴, 并沿着穗轴内部微管束组织和皮层组织向上和下延伸, 侵入邻近小穗。【结论】病原菌在接种小穗中生长后, 沿着柱头、子房或内、外稃内表面, 经过靠近穗轴的致密组织, 侵入邻近小穗, 感染整个麦穗, 直至到达茎秆。

关键词: 赤霉病; 回复突变体; 绿色荧光蛋白; 侵染过程

Infection of *Fusarium graminearum* on Wheat Spikes with Green Fluorescence Protein-Tagged Revertants

ZHANG Xu¹, Theo van de Lee², LU Wei-zhong¹, YU Da-zhao³, MA Hong-xiang¹

(¹Institute of Agro-Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; ²Plant Research International, Wageningen, 6700 AA, The Netherlands; ³Institute of Plant Protection and Soil Science, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China)

Abstract: 【Objective】*Fusarium* head blight, caused by *Fusarium graminearum*, is a very serious disease in wheat and barley production area. Understanding the infection mechanism of *F. graminearum* plays an important role for the disease control. 【Method】In present study, virulence and infection process of 269 green fluorescence protein (GFP)-tagged revertant mutants were evaluated by single floret injection and GFP screening. 【Result】Results showed distinct difference among virulent revertants. When a wheat spike was inoculated by the mutants with reduced virulence, only the injected spikelet showed symptom at 6 days past inoculation (dpi). On the contrast, the diseased spikelets were up to 5 at 6 dpi when the spike was inoculated by the mutants with increased virulence. GFP signals indicated that mutant with reduced virulence colonized only in the inoculated spikelet and stop at the compact tissue of rachis at 6 dpi while mutant with increased virulence extended through compact tissue to rachis and infected to the adjacent spikelets by spreading upward and downward to adjacent florets inter- and intra- cellularly in vascular bundles and cortical tissue of the rachis. 【Conclusion】It could be concluded that *F. graminearum* germinated in the inoculated spikelets, grew on the top of stigma and ovary or between lemma and palea, and extended towards and through rachis to the adjacent spikelets to infect the whole spike.

Key words: *Fusarium* head blight; Revertant mutant; Green fluorescence protein; Infection process

收稿日期: 2007-09-12; 接受日期: 2008-02-28

基金项目: 国家“973”KNOW-MOST项目(2004CB720407); 国家“863”项目(2006AA100102); 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-048)

作者简介: 张旭(1973-), 女, 江苏武进人, 副研究员, 研究方向为小麦抗病分子遗传与分子育种。Tel: 025-84390351; E-mail: zhangxu7309@hotmail.com。通讯作者马鸿翔(1965-), 男, 江苏宝应人, 研究员, 博士, 研究方向为小麦生物技术育种。Tel: 025-84390300; E-mail: mahx@jaas.ac.cn

0 引言

【研究意义】禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 侵染大、小麦穗部引起赤霉病 (*Fusarium head blight*)。赤霉病不仅造成大、小麦严重减产, 而且其产生的毒素污染大、小麦籽粒, 严重影响面粉制品和啤酒加工品质与人畜健康^[1~3]。国内外十分重视赤霉病及其防治研究, 已在赤霉病的病原鉴定、病害流行规律、品种抗性遗传、抗病品种选育以及病害防治等方面开展了大量工作, 并取得了一系列进展^[4~8]。但人们对赤霉病菌的致病机理及寄主的抗病机制至今仍缺乏全面的了解。病原菌的致病机制研究, 主要集中于赤霉病菌的次生代谢物及其它物质与病原菌致病性的关系, 对病原菌的侵染机制和致病机理尚缺乏系统研究^[9]。【前人研究进展】国内外学者曾对赤霉病菌在小麦穗部的侵染过程进行了研究, 但所获结论并不一致。Dickson 等^[10], Pugh 等^[11]通过组织学观察, 认为病菌通常先侵染花药, 随后经花药蔓延到达子房、颖片和穗轴, 因此认为花药在发病中起着重要的作用。但 Schroder^[12]的研究认为, 病菌可从小麦穗部的任何部位侵入, 而不必经由花药。康振生等^[13~15]采用扫描和透射电镜技术观察禾谷镰刀菌在小麦穗部的侵染过程证实, 分生孢子在任何部位均可萌发, 在寄主体表生长扩展后产生入侵菌丝, 以直接入侵方式侵入寄主组织体内, 这一发现也证明病菌可不经由残留花药而直接侵染小麦穗部组织引致病害。【本研究切入点】近年来发展起来的绿色荧光蛋白标记系统与荧光显微技术为微生物研究提供了有效手段^[16~18], 可以对病原菌和寄主的相互作用进行长期监测。同样, 病原菌突变体也是研究病原菌致病机理的重要手段之一。【拟解决的关键问题】本研究利用 Dufresne 等^[19]获得的来源于以荧光蛋白标记的禾谷镰刀菌野生型菌株 Fg820-GFP 的 269 株回复突变体, 通过人工接种方法研究突变体的致病力变异及其在小麦穗部的侵染过程, 以期阐明禾谷镰刀菌的致病机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2006 年在荷兰国际植物研究所进行。

1.1.1 植物材料 研究所用的小麦品种为荷兰春小麦品种 Lavett。

1.1.2 病原菌 研究所用的禾谷镰刀菌回复突变体为 Fg820-nia6-tr11-GFP 突变体 (简称突变体), 共 269

株, 由法国 Paris-Sud 大学提供, 野生菌株为 Fg820-GFP (简称 Fg820), 由荷兰国际植物研究所保存。

1.2 试验设计

每个麦穗接种 3 朵小花, 每个突变体接种 3 个麦穗, 随机区组设计。同时每 24 个突变体接种 1 次 Fg820 和液体培养基作为试验对照, 共分别接种 36 个麦穗。

1.3 突变体致病力鉴定

1.3.1 接种鉴定 赤霉病接种鉴定采用单花滴注接种方法。具体方法为取当天开花的麦穗, 接种 3 个位点, 即以麦穗自下至上接种第 3、8、13 个小穗的第 1 朵小花 (简称第 3、8、13 朵小花)。每朵小花接种 500 个病原菌分生孢子, 麦穗置于 20℃ 80% 湿度的恒定条件下离体培养, 于第 6 天进行调查统计。

1.3.2 数据调查 以接种小麦的病小穗数作为突变体致病力调查指标, 每个重复取各接种点病小穗数的平均数。

1.3.3 GFP 荧光检测 接种麦穗经纵向切开后, 置于莱卡 MZ FLIII 荧光体式显微镜下 (荧光过滤镜片 GFP2), 观察荧光信号并照相记录。

1.4 数据分析

所有数据采用 SAS 软件 9.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 禾谷镰刀菌突变体致病力测定结果

接种 3 d 后在接种部位开始出现病症, 此后由接种点向周围扩展。接种 6 d 后, 269 个突变体平均病小穗数从 1 到 3.89 不等, 呈连续性分布 (图 1), 突变体群体平均病小穗数为 2.25, 而野生菌株 Fg820 的平

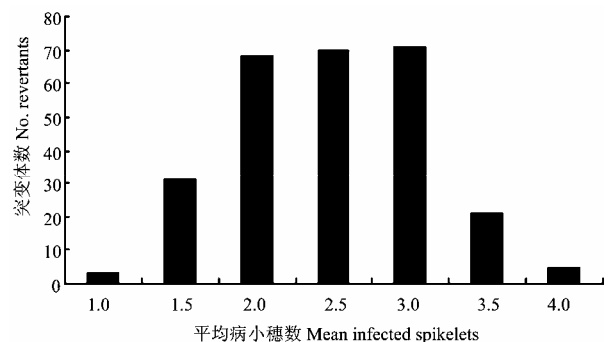


图 1 不同突变体接种 6 d 后的病小穗数

Fig. 1 Infected wheat spikelets at 6 days after revertants inoculation

均病小穗数为 2.33 (表 1)。其中 209 株 (78%) 突变体致病力接种后的表现与野生菌株表现一致, 接种 6 d 后接种小穗病症明显, 病原菌已扩展到邻近小穗, 平均病小穗数为 2~3。突变体之间致病力变异较大, 达到极显著水平 ($P < 0.001$) (表 2)。突变体 83, 157, 236 致病力显著减弱, 调查时只有接种小穗呈现病症, 鲜有菌丝产生, 平均病小穗数仅为 1 (图 2, 表 3), 另有 11 个突变体平均病小穗数小于 1.25, 致病力也明显降低。突变体 22、144、G4、G12、G13 致病力明显增强, 接种后平均病小穗数超过 3.5, 并生长浓密菌丝 (图 2, 表 3)。

利用同一突变体接种, 麦穗不同部位对发病的小

穗数也有显著差异 (表 2)。接种于第 3 朵小花的病小穗数明显低于第 8 朵和第 13 朵小花处的病小穗数, 这说明麦穗的不同部位抗扩展性存在明显差异。

2.2 禾谷镰刀菌侵染机理

根据 GFP 信号追踪病原菌侵染途径, 所有突变体的孢子以及野生菌株 Fg820, 滴注于接种小穗内部后, 均能在小穗内部正常萌发生长。禾谷镰刀菌孢子主要着陆于柱头、子房顶部或者内、外稃内表面, 而在内、外稃外表面直至接种后第 6 天也很难检测到 GFP 信号 (图 3-A, B, E)。同样也很少在花药表面或内部发现 GFP 信号 (图 3-A, C, H), 表明病原菌主要侵染小麦子房与内、外稃内表面。弱致病力突变体在接种

表 1 突变体接种 6 d 后的病小穗数平均值及其变化范围

Table 1 Infected spikelets of revertants at different locations at 6 dpi of revertants

		平均病小穗数 Mean infected spikelets	接种位点 1 Location 1	接种位点 2 Location 2	接种位点 3 Location 3
突变体 Revertant	平均 Mean	2.25	1.64	2.45	2.65
	最低值 Minimum	1.0	1.0	1.0	1.0
	最高值 Maximum	3.89	4.33	5.0	5.0
Fg820 Wild type	平均 Mean	2.33	2.0	2.33	2.67
	最低值 Minimum	2.0	2.0	2.0	2.0
	最高值 Maximum	2.67	2.0	3.0	3.0

表 2 病小穗数的方差分析

Table 2 ANOVA of infected spikelets

变异来源 Variation source	DF	方差和 SS	均方 MS	F 值	Pr > F
突变体 Revertant	268	883.487	3.297	3.49	<0.0001
接种位点 Injected location	2	454.014	227.007	240.45	<0.0001
重复 Repeat	2	1.195	0.597	0.63	0.5312
突变体 × 接种位点 Revertant × injected location	535	620.333	1.160	1.23	0.0015



A: 培养基接种
A: Incultated by medium

B: Fg820-GFP 接种
B: Incultated by Fg820-GFP

C: 弱致病力突变体接种
C: Incultated by revertant with reduced virulence (RRV)

D: 强致病力突变体接种
D: Incultated by revertant with increased virulence (RIV)

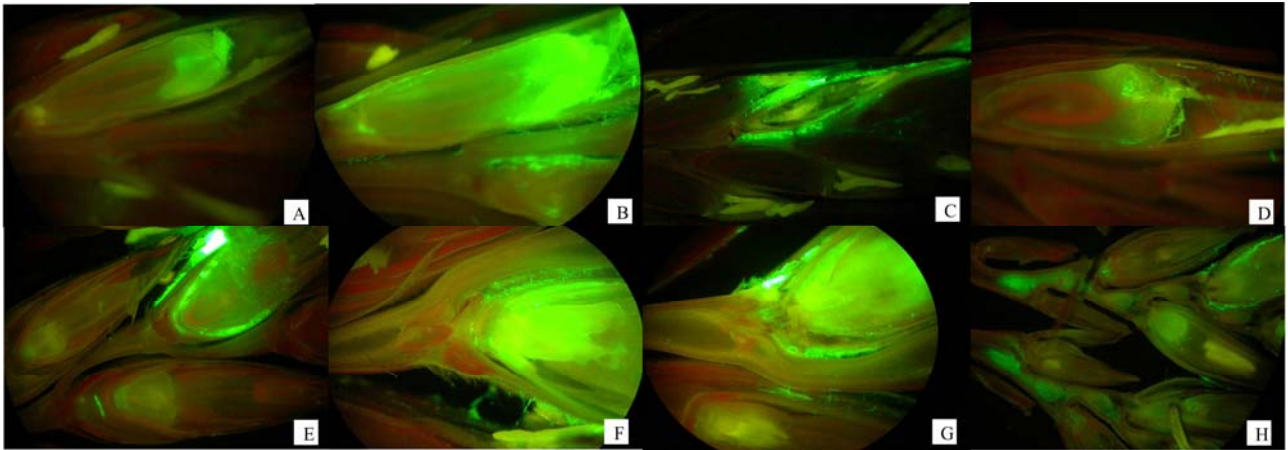
图 2 禾谷镰刀菌突变体的致病力表现

Fig. 2 Pathogenicicity of *F. graminearum* revertants

表 3 部分突变体对小麦的致病力

Table 3 Pathogenicity of some revertants on wheat

突变体 Revertant	病小穗数 Infected spikelets	差异显著性 Significant difference ($P < 0.05$)	突变体 Revertant	病小穗数 Infected spikelets	差异显著性 Significant difference ($P < 0.05$)	突变体 Revertant	病小穗数 Infected spikelets	差异显著性 Significant difference ($P < 0.05$)
144	3.89	A	124	3.44	ABCDE	239	1.11	RS
G13	3.78	AB	133	3.33	ABCDEF	158	1.11	RS
G12	3.78	AB	G1	1.44	OPQRS	83	1	S
G4	3.67	ABC	242	1.33	PQRS	236	1	S
22	3.56	ABCD	152	1.22	QRS	157	1	S



A: 突变体侵染子房顶部 (接种后 2 d); B: 突变体在小穗内生长 (接种后 6 d); C: 突变体未侵染花药 (接种后 6 d); D: 弱致病力突变体侵染柱头 (接种后 2 d); E: 弱致病力突变体在内、外稃内表面生长 (接种后 6 d); F: 弱致病力突变体终止于致密组织处 (接种后 6 d); G: 强致病力突变体穿越致密组织 (接种后 2 d); H: 强致病力突变体侵染穗轴及邻近小穗 (接种后 6 d)

A: Revertant infected top of ovary at 2 dpi; B: Revertant colonized in spikelet at 6 dpi; C: Revertant didn't infect anthers at 6 dpi; D: RRV infected stigma at 2 dpi; E: RRV grew between lemma and palea at 6 dpi; F: RRV stop at rachis at 6 dpi; G: RIV past through rachis at 2 dpi; H: RIV infected adjacent spikelet at 6 dpi

图 3 突变体在麦穗内的侵染途径

Fig. 3 Infection process of revertants on wheat spikes

2 d 后, 开始着陆于小穗内部, 在接种 6 d 后, 病原菌仍只在接种小穗内生长、延伸, 并终止于小穗基部的致密组织处 (图 3-D, E, F)。强致病力突变体在接种小穗内生长 2 d 后, 病原菌即能够通过小穗基部的致密组织到达小麦穗轴 (图 3-G), 并沿着穗轴内部微管束组织和皮层组织向上和下延伸, 侵入邻近小穗, 接种 6 d 后已延伸至整个小穗 (图 3-H)。

3 讨论

病原菌突变体是研究赤霉病致病性和致病机理的重要手段之一。Jenczmionka 等^[20]通过去除了 Gpmk1 MAP 激酶的突变体研究病原菌侵染寄主的机制, 揭示禾谷镰刀菌在早期侵染过程中依赖于细胞壁降解酶的分泌。姚红燕等^[21]对禾谷镰刀菌 *Tri12* 基因敲除突变

体的致病力进行了鉴定, 研究表明 *Tri12* 的敲除导致病菌产生的毒素不能被泵出体外毒害寄主, 进而在病菌体内积累抑制自身生长和毒素的进一步产生, 从而降低病菌的致病力。但这些突变体只是针对某一个特定基因, 缺乏研究的系统性。胡广淦等^[22]利用紫外线等方法, 获得营养突变体, 并发现 *nit* 突变株的致病力强弱与其所属生理表现型没有相关性。Kim 等^[23]通过限制酶介导的整合 (REMI) 技术获得 2 株营养缺陷型突变体, 并证明其致病力降低与编码乙酰基合成酶的 *ARG2* 基因及编码磷酸核糖胺-氨基乙酸连接酶的 *ADE5* 基因相关。为了系统研究禾谷镰刀菌基因组上不同基因的作用, Dufresne 等^[19]利用 *mimp1/impala* 双因子系统, 通过剪切-粘贴机制在全基因组范围内构建了禾谷镰刀菌回复突变体, 与传统的诱变方法相比,

该技术可以通过引入插入突变标记使得突变基因容易被鉴定和克隆出来, 在植物病原真菌的基因克隆上有着明显的优势。本研究对该突变体库中的 268 个突破体进行鉴定, 结果表明, 不同突变体间的致病力有极显著差异, 接种 6 d 后平均病小穗数从 1 到 3.89 不等, 呈连续性分布, 试验鉴定出了 3 个致病力明显减弱及 5 个致病力明显增强的突变体。目前禾谷镰刀菌基因组测序已经完成, 可以通过 TAIL-PCR 或者 IPCR 等技术, 寻找致病力变异突变体被插入基因位点, 再通过测序及 Blast 等方法, 鉴定并克隆病原菌致病性相关基因。

本研究同时发现, 在麦穗不同部位接种赤霉病菌, 其出现病症的小穗数有明显差异, 接种于麦穗第 8 朵和第 13 朵小花处的发病小穗数明显高于接种于第 3 朵小花的。推测这与不同部位的小穗的生长发育状态有关。第 8 朵和第 13 朵小花位于麦穗的中上部, 中部小穗在接种当天处于扬花期, 小花的张开为病菌与颖片、外稃、内稃内表面和子房部位的接触提供了良好的机会。第 3 朵小花位于麦穗基部, 在接种当天小穗所处的生育期相对于中部小穗较迟, 并不适合病原菌的侵入与生长。因此在采用单花滴注对赤霉病进行人工接种鉴定时应该注意接种部位的统一。

病原菌侵染寄主植物和在寄主体内繁殖扩展, 与病原菌的侵染特性、寄主植物的生长发育特性及病原菌-寄主互相作用的特点都有着密切的联系。早期的研究表明, 病菌通常先侵染残留在小穗内的花药, 随后病菌经由花药蔓延到子房、颖片和穗轴, 因而认为花药在发病中起着重要作用^[10,11]。然而 Schroeder^[12]、康振生等^[13]的研究表明, 赤霉病菌可不必经过残留花药而直接入侵小麦穗部组织导致病害。结果的不一致可能与小麦花器官结构复杂及观测手段不同有关。GFP 作为标记物具有检测方便、荧光稳定、通用性好、分子量小以及对细胞无毒害、可进行活细胞实时定位观察等优点, 目前已广泛应用于植物病原体研究、蛋白质定位、移动及相互关系、及信号转导研究^[24,25]。本研究利用 GFP 追踪病原菌的侵染过程, 结果表明, 接种 6 d 后, 绝大部分赤霉病菌分生孢子已侵染子房和颖片, 但没有侵染小穗内花药。在接种后 48 h、96 h 左右, 也很少在小穗内的花药上观察到 GFP 信号。证明病原菌可不经由花药而直接侵染小麦穗部, 花药并不是病原菌致病的必需因素。病菌对小麦穗部的入侵部位具有选择性, 入侵主要发生于小麦外稃和内稃的内表面, 以及子房的顶部。这种侵染差异性与小麦穗

部不同部位的理化特征和形态结构特征密切相关。而外稃和内稃的内表面及子房等部位, 蜡质层较薄, 着落在外稃、内稃内表面和子房顶部的病菌孢子可顺利地萌发生长、产生侵染结构, 进而引起病害。因此, 小麦外稃、内稃的内侧和子房往往易受病菌侵染, 这一结果与康振生^[13]等采用扫描和透射电镜技术观察的禾谷镰刀菌侵染过程较一致。荧光显微观察还发现, 不同致病力突变体在小麦组织内侵染和扩展能力不同, 弱致病力突变体只能在接种小穗内生长、延伸, 并终止于小穗基部的致密组织处。而强致病力突变体在接种小穗内生长 2 d 后, 病原菌即能够通过小穗基部的致密组织到达小麦穗轴, 并沿着穗轴内部微管束组织和皮层组织向上和下延伸, 侵入邻近小穗。

4 结论

269 株绿色荧光蛋白 (GFP) 标记的禾谷镰刀菌回复突变体致病力存在明显分化。致病力增强的病原菌在接种小穗中生长后, 沿着柱头、子房或内、外稃内表面, 通过小穗基部的致密组织到达小麦穗轴, 并沿着穗轴内部微管束组织和皮层组织向上和下延伸, 侵入邻近小穗, 感染整个麦穗, 直至到达茎秆。而弱致病突变体在接种后仅在接种小穗内生长、延伸, 并终止于小穗基部的致密组织处。

References

- [1] Zhang X, Zhou M P, Ren L J, Bai G H, Ma H X, Scholten O E, Guo P G, Lu W Z. Molecular characterization of *Fusarium* head blight resistance from wheat variety Wangshuibai. *Euphytica*, 2004, 139: 59-64.
- [2] Bai G H, Shaner G. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 42: 135-161.
- [3] Ren L J, Shen X R, Zhou M P, Zhang X, Ma H X, Lu W Z, Nicholson P. SSR markers for *Fusarium* head blight resistance QTLs in three wheat populations. *Agricultural Sciences in China*, 2003, 2: 987-993.
- [4] O'Donnell K, Kistler H C, Tacke B K, Casper H H. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(14): 7905-7910.
- [5] Arseniuk E, Góral T, Czembor H J. Reaction of triticale, wheat and rye accessions to graminaceous *Fusarium* spp. infection at the seedling and adult plant growth stages. *Euphytica*, 1993, 70: 175-183.

- [6] Ban T, Suenaga K. Genetic analysis of resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum* in Chinese wheat cultivar Sumai 3 and the Japanese cultivar Saikai 165. *Euphytica*, 2000, 113: 87-99.
- [7] Liu S, Anderson J A. Marker assisted evaluation of *Fusarium* head blight resistant wheat germplasm. *Crop Science*, 2003, 43: 760-766.
- [8] Nicholson P, Gosman N, Draeger R, Thomsett M, Chandler E, Steed A. The *Fusarium* head blight pathosystem In: Buck H T, Nisi J E, Salomon N. *Wheat Production in Stressed Environments*. New York: Springer Press, 2007: 23-36.
- [9] 陆维忠, 程顺和, 王裕中. 小麦赤霉病研究. 北京: 科学出版社, 2001: 7-13.
Lu W Z, Cheng S H, Wang Y Z. *Wheat Scab Research*. Beijing: Science Press, 2001: 7-13. (in Chinese)
- [10] Dickson J G, Johann H, Wineland G. Second progress report on the *Fusarium* blight (scab) of wheat. *Phytopathology*, 1921, 11: 35.
- [11] Pugh G W, Johann H, Dickson J G. Factors affecting infection of wheat heads by *Gibberella saubinetii*. *Journal of Agricultural Research*, 1933, 46: 771-797.
- [12] Schroeder H W, Christen J J. Factors affecting the resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 1963, 53: 831-838.
- [13] 康振生, 黄丽丽, Buchenauer H, 韩青梅, 蒋选利. 禾谷镰刀菌在小麦穗部侵染过程的细胞学研究. 植物病理学报, 2004, 34(4): 329-335.
Kang Z S, Huang L L, Buchenauer H, Han Q M, Jiang X L. Cytology of infection process of *Fusarium graminearum* on wheat spikes. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, 34 (4): 329-335. (in Chinese)
- [14] Kang Z, Buchenauer H. Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2000, 57: 255-268.
- [15] Kang Z, Buchenauer H. Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. *European Journal of Plant Pathology*, 2002, 108: 653-660.
- [16] 周 琴, 孙 明, 周俊初, 喻子牛. 绿色荧光蛋白基因 *gfp* 在苏云金芽胞杆菌中表达的初步研究. 中国农业科学, 2003, 36(8): 81-98.
Zhou Q, Sun M, Zhou J C, Yu Z N. A preliminary study on the expression of *gfp* gene in *Bacillus thuringiensis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36(8): 81-98. (in Chinese)
- [17] 吴立柱, 赵宝存, 齐志广, 葛荣朝, 马闻师, 沈银柱, 黄占景. 小麦糖原合成酶激酶(TaGSK1)的亚细胞定位及功能鉴定. 中国农业科学, 2006, 39(4): 842-847.
Wu L Z, Zhao B C, Qi Z G, Ge R C, Ma W S, Shen Y Z, Huang Z J. Localization and function analysis of wheat glycogen synthetase kinase (TaGSK 1). *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(4): 842-847. (in Chinese)
- [18] Lübeck M, Knudsen I M B, Jensen B, Thrane U, Janvier C, Jensen D F. GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. *Mycological Research*, 2002, 106 (7): 815-826.
- [19] Dufresne M, Hua-Van A, Wahab H A, Ben M'Barek S, Vasnier C, Teyssset L, Kema G H J, Daboussi M J. Transposition of a fungal miniature inverted-repeat transposable element through the action of a Tc1-like transposase. *Genetics*, 2007, 175: 441-452.
- [20] Jenczmionka N J, Schäfer W. The Gpmk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzyme. *Current Genetics*, 2005, 47: 29-36.
- [21] 姚红燕, 陈利锋, 孙 枫, 陈官菊, 俞 刚. 禾谷镰孢 Tri12 基因敲除突变体的致病力. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 32-36.
Yao H Y, Chen L F, Sun F, Chen G J, Yu G. Significant reduction in pathogenicity in *Fusarium graminearum* caused by knock-out of Tri12, a trichothecene efflux pump gene. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2005, 28(2): 32-36. (in Chinese)
- [22] 胡广淦, 徐敬友, 王彰明, 李清铄. 禾谷镰刀菌营养缺陷型的诱导与特性研究. 植物病理学报, 1994, 24(4): 373-377.
Hu G G, Xu J Y, Wang Z M, Li Q X. Induced auxotrophs of *Fusarium graminearum* and their properties. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1994, 24(4): 373-377. (in Chinese)
- [23] Kim J E, Myong K, Shim W B, Yun S H, Lee Y W. Functional characterization of acetylglutamate synthase and phosphoribosylamino-glycine ligase genes in *Gibberella zeae*. *Current Genetics*, 2007, 51: 99-108.
- [24] 吴 瑞, 张树珍. 绿色荧光蛋白及其在植物分子生物学中的应用. 分子植物育种, 2005, 3 (2): 240-244.
Wu R, Zhang S Z. Green fluorescent protein and its application in plant molecular biology. *Molecular Plant Breeding*, 2005, 3(2): 240-244. (in Chinese)
- [25] Skadsena R W, Hohn T M. Use of *Fusarium graminearum* transformed with *gfp* to follow infection patterns in barley and *Arabidopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2004, 64: 45-53.

(责任编辑 赵利辉, 毕京翠)