

利用荧光蛋白标记西瓜枯萎病菌的 过氧化物酶体及细胞核

施笑笑^{1,2} 王教瑜^{2*} 肖琛闻³ 王艳丽² 李大勇⁴ 柴荣耀² 孙国昌^{2*}

(¹浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004; ²农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021; ³浙江省农业科学院畜牧兽医研究所, 杭州 310021; ⁴浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310058)

摘要 西瓜枯萎病是一种世界范围的西瓜毁灭性病害, 其病原菌为尖孢镰刀菌西瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, FON)。研究病原菌生长发育和侵染的机制是解决病害的根本途径。利用荧光蛋白对细胞或细胞器进行标记, 是病原菌研究中的重要方法。该研究利用绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白对FON的细胞核和过氧化物酶体进行了荧光标记。通过农杆菌介导转化 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, AtMT), 该文将3种不同的荧光定位载体分别导入FON, 获得了细胞核红色荧光标记的转化子(潮霉素抗性, 含mCherry-H2B融合蛋白), 以及过氧化物酶体绿色(潮霉素抗性, 含GFP-PTS1融合蛋白)和红色(潮霉素抗性, 含DsRED-PTS1融合蛋白)荧光标记的转化子各1种。在标记细胞核的菌株中, 菌丝、孢子都可见明亮、圆形的红色荧光点, 荧光点与DAPI染色标记的细胞核区域完全重合。在过氧化物酶体标记的菌株中, 菌丝、孢子中可见明亮的红色或绿色荧光成小点状分布, 符合过氧化物酶体的分布特征, 而且在脂类物质诱导的条件下, 荧光点的数量明显增加。此外, 该文还利用细胞壁荧光染色剂卡氏白对3种荧光蛋白标记菌株进行染色。结果显示, 卡氏白染色产生的蓝色荧光与红、绿荧光蛋白的荧光在FON中互不干扰。转化子继代培养和初步分析表明, 其表型与野生型无差异, 菌株继代后荧光表达稳定、定位明显。该结果为进一步研究FON细胞器动态、生长发育与致病分子机制提供了方法和工具。

关键词 西瓜枯萎病菌; GFP; mCherry; DsRED; 荧光标记

Fluorescent Labeling the Peroxisome and Nucleus in *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*

SHI Xiaoxiao^{1,2}, WANG Jiaoyu^{2*}, XIAO Chenwen³, WANG Yanli², LI Dayong⁴, CHAI Rongyao², SUN Guochang^{2*}

(¹College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; ²State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ³Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ⁴College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract FON (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*) causes watermelon *Fusarium* wilt, a destructive disease on watermelon worldwide. Research on the development and pathogenesis of FON lays the foundation for the

收稿日期: 2019-09-04 接受日期: 2019-11-22

国家自然科学基金(批准号: 31470249)和浙江省重点研发计划(批准号: 2019C02010)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86404226, E-mail: wangjiaoyu78@sina.com; sungc01@sina.com

Received: September 4, 2019 Accepted: November 22, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31470249) and the Key Technology Research and Development Program of Zhejiang Province (Grant No.2019C02010)

*Corresponding authors. Tel: +86-571-86404226, E-mail: wangjiaoyu78@sina.com; sungc01@sina.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5171>

control of the disease. Fluorescent labeling of the organelles and cell structures using fluorescent proteins is an important strategy in the investigations on fungal development and pathogenesis. In the present work, the nuclei and peroxisomes of FON were labeled with green or red fluorescent proteins. Via *AtMT* (*Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation), we generated three types of FON transformants which carried nuclei labeled with mCherry, peroxisomes labeled with GFP or peroxisomes labeled with DsRED, respectively. In the strains with mCherry labeled nuclei, the bright red fluorescence in round dots were detected in hyphae and conidia, overlaying well with the fluorescence formed by DAPI staining. In the strains with GFP or DsRED labeled peroxisomes, green or red small fluorescent dots were present in hyphal and conidial cells, corresponding with the distribution of peroxisomes in fungal cells. Further, the numbers of the fluorescent dots was increased significantly on lipids. Calcofluor white staining was also performed on the three transformants. Under confocal microscopy, the blue fluorescence of Calcofluor white cooperated well with the fluorescence of green or red fluorescent proteins, producing ideal multi-fluorescent images. In addition, the fluorescent proteins could be stably expressed and well distributed during the subcultivation of the transformants. The growth and phenotypes of the transformants were unaltered compared with the wild type strain. We provided a useful tool for the study on the organelle dynamics, development and pathogenesis of FON.

Keywords *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; GFP; mCherry; DsRED; fluorescent labeling

西瓜枯萎病又被称为蔓割病、走藤死、萎焉病^[1],是由半知菌亚门真菌——尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, FON)侵染维管束引起的一种毁灭性土传真菌病害,在西瓜的开花期、坐果期等各个生育期都可能发病,以坐果期和瓜膨大期发病最重^[2]。西瓜枯萎病在世界范围广泛发生,是西瓜上危害最严重,造成经济损失最大的病害之一。我国西瓜枯萎病的发生面积约占西瓜总栽培面积的42%^[3]。FON共有4个生理小种,分别为0号、1号、2号和3号,目前在世界生产中造成危害的主要是1号生理小种^[4-5]。

荧光蛋白标记是研究启动子活性、基因表达动态、蛋白的细胞和亚细胞定位以及生物体生长发育等的有效方法^[6]。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是1962年在发光水母(*Aequorea victoria*)中发现的,具有稳定、直观、操作方便的荧光性质,且不需要添加外源底物本身即可发光,可以在活细胞中直接进行定位观察和检测,是目前应用最广泛的荧光蛋白^[7]。红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)是1999年MATZ等^[8]从珊瑚虫(*Discosoma* sp.)中分离的,最大吸收波长为558 nm,最大发射波长为583 nm。2003年,MIKKELSEN等^[9]将红色荧光蛋白(DsRED)首次成功应用于丝状真菌中,此后在真菌功能基因研究中的应用逐渐增多。红色荧光蛋白具有许多变体。这些荧光蛋白变体表现出不同

的光谱和理化特性,呈现出各种颜色的荧光,根据所发射荧光的颜色,被命名为mBanana、mOrange、dTomato、mTangerine、mStrawberry和mCherry等。其中mCherry在587 nm的激发光下,发射610 nm的荧光,在荧光显微镜下呈樱桃红色,具有成熟快、单体特性好等优点,应用范围广^[10]。DAPI和卡氏白(Calcofluor white)分别是标记细胞核和真菌细胞壁的2种荧光染料。DAPI可以穿透细胞膜,能够以非嵌入式的方式与DNA特异性结合^[11]。卡氏白能够结合真菌细胞壁中的纤维素和几丁质,在荧光显微镜下能够观察到蓝色荧光^[12](吸收波长405 nm、发射波长410~480 nm)。

过氧化物酶体(peroxisome)是真核生物中普遍存在的一类单层膜细胞器,内含多种酶类,参与多种重要的代谢过程,如脂肪酸 β -氧化、乙醛酸循环、胆固醇合成、活性氧的生成与降解等。在丝状真菌中,过氧化物酶体还参与黑色素生物合成、伏鲁宁体产生等过程^[13]。研究表明,过氧化物酶体在稻瘟病菌、瓜类炭疽病菌等植物病原真菌致病过程中发挥重要作用^[14]。此外,细胞分裂的精确调控是真菌生长、发育和致病的基础。因此,研究细胞核在生长发育和致病过程中的生长与分裂动态,对揭示病原真菌致病机制具有重要意义。组蛋白是1种碱性DNA结合蛋白,主要定位于细胞核。利用组蛋白与荧光蛋白的融合表达可以实现细胞核的荧光标记,

辅助细胞核动态观察^[15]。

本研究利用含有潮霉素标记基因和不同启动子的GFP、DsRED和mCherry荧光定位载体, 通过农杆菌介导转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, *AtMT*)导入FON中, 得到过氧化物酶体以及细胞核荧光标记的FON菌株, 并结合荧光染色的方法对标记菌株进行观察。此外, 我们还构建了FON的*AtMT*转化子库, 抽检表明这些转化子遗传稳定, 非特异性表型少。上述结果为FON的致病机理研究提供了重要的方法和基础。

1 材料和方法

1.1 供试菌株及培养

FON 1号生理小种的野生型菌株及各转化子菌株均在完全培养基(complete medium, CM)^[16]中于26℃下培养。

1.2 质粒及*AtMT*转化

质粒pHMGA与pHMR1分别含有受稻瘟病菌MPGI(MGG_10315)启动子控制的具有过氧化物酶体定位信号PTS1的GFP(GFP-PTS1)和DsRED(DsRED-PTS1), 是由本实验室原有载体p1300BMGFPA和p1300NMRFPA改造而成: 将p1300BMGFPA中的*BAR*基因和p1300NMRFPA中的*NPTII*基因替换为潮霉素抗性基因(*HPH*)^[17]。质粒pKD9-mCherry-H2B^[18](浙江大学卢建平教授惠赠)含有由稻瘟病菌组蛋白*H3*基因(MGG_01159)启动子控制的具有mCherry标记的组

蛋白H2B(mCherry-H2B)。

通过*AtMT*^[19-20]转化将pHMGA、pHMR1、pKD9-mCherry-H2B(图1)分别导入到FON中, 获得转化子菌株FON-HMGA、FON-HMR1、FON-mCherry-H2B。所用农杆菌菌株为*AGL1*。农杆菌培养用YEB培养基(5 g牛肉浸膏、1 g酵母提取物、5 g蛋白胨、5 g蔗糖、0.04 g MgSO₄·7H₂O)。IM培养基用于FON与农杆菌的共培养^[21]。含400 μg/mL潮霉素B(Roche, Mannheim, Germany)的CM平板用于转化子的筛选。

1.3 转化子的荧光稳定性及PCR检测

所得转化子用ZEISS荧光显微镜进行初检, 确定转化子是否发出对应的荧光。将能够观察到荧光的转化子接种到CM培养基继代培养5代后, 再次利用ZEISS荧光显微镜观察菌丝和孢子的荧光, 分析转化子继代的荧光稳定性。

对第1代和第5代转化子进行PCR检测, 明确其是否含有潮霉素抗性基因和对应的荧光蛋白基因: 以菌株基因组DNA为模板, 以引物HPH52/HPH34扩增潮霉素抗性基因片段, 以引物GFP1-CHK1/GFP-CHK2扩增GFP基因片段, 以引物RED1/RED2扩增DsRED和mCherry基因片段。引物序列见表1。基因组DNA提取采用CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)^[16]法。PCR、电泳等采用标准程序。

1.4 激光共聚焦观察与荧光染料的共定位

选取荧光表达强、定位清晰、继代稳定的

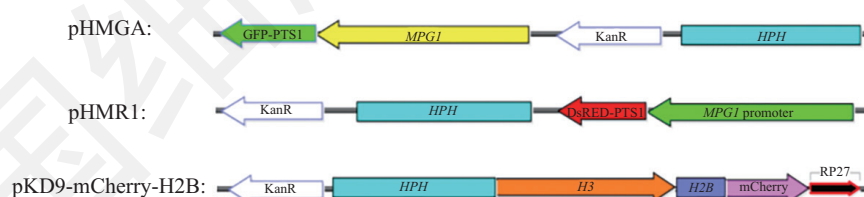


图1 pHMGA、pHMR1、pKD9-mCherry-H2B的结构

Fig.1 The structures of pHMGA, pHMR1 and pKD9-mCherry-H2B

表1 本研究所用引物列表

Table 1 Primers used in this work

名称	序列	PCR产物长度
Name	Sequence	Length of PCR product
HPH52	5'-AGC TGC GCC GATGGT TTC TAC AA-3'	585 bp
HPH34	5'-GCG CGT CTG CTG CTC CAT ACA A-3'	
GFP-CHK1	5'-GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC CTG-3'	502 bp
GFP-CHK2	5'-GGG TGC TCA GGT AGT GGT TGT CGG-3'	
RED1	5'-GAT GGT GTA GTC CTC GTT GTG-3'	368 bp
RED2	5'-GAC TAC TTG AAG CTG TCC TTC C-3'	

FON-HMGA、FON-HMR1、FON-mCherry-H2B转化子, 挑取少量菌丝和孢子, 在激光共聚焦显微镜(ZEISS LSM780)观察并记录荧光定位情况。

利用卡氏白和DAPI 2种荧光染料对转化子菌株的细胞壁和细胞核进行荧光染色。挑取少量菌丝和孢子, 滴加10 μ L 50 μ g/mL的卡氏白(溶于水)染色液, 避光染色5 min。运用类似方法滴加10 μ L 50 μ g/mL的DAPI(溶于水)染色液对FON-mCherry-H2B转化子染色, 进行荧光观察(在激发波长543 nm、发射波长570~630 nm下, 观察红色荧光; 在激发波长488 nm、发射波长495~550 nm下, 观察绿色荧光; 在激发波长405 nm、发射波长410~480 nm下, 观察蓝色荧光)。

1.5 转化子表型观察

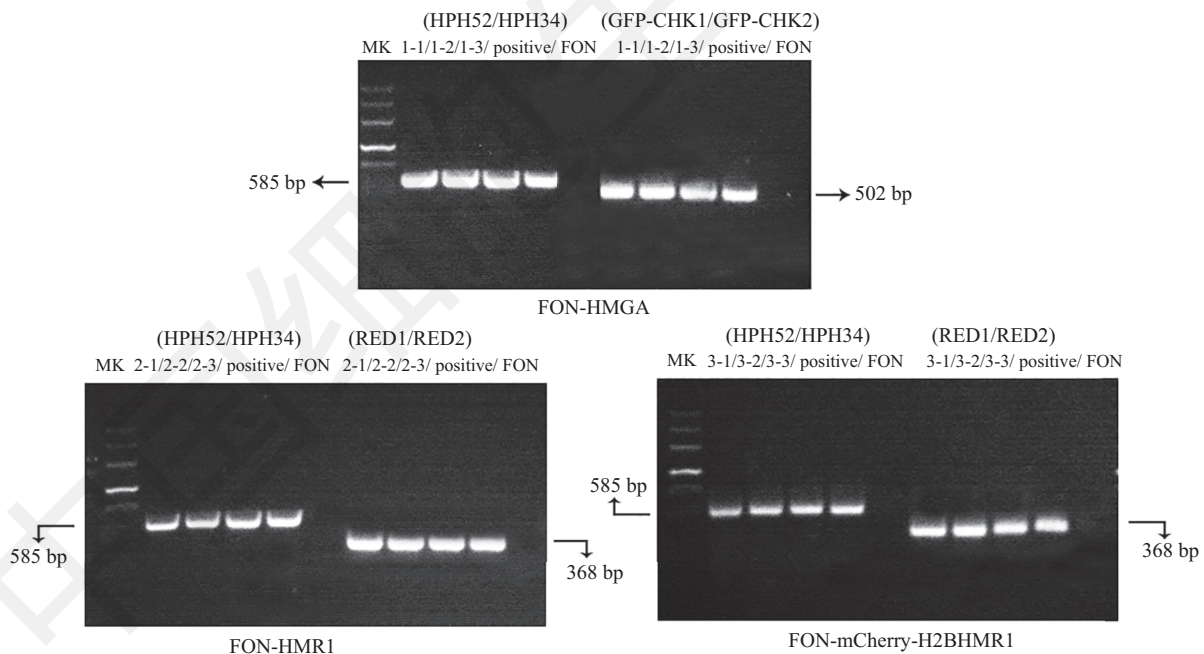
对第5代的转化子进行初步的表型分析。利用直径0.5 cm的打孔器分别在转化子和野生型菌株FON的边缘打取菌落圆饼, 接种到CM板上, 每个菌株3个重复, 28 $^{\circ}$ C光暗交替培养3天, 测量菌落直径并拍照, 统计分析生长速度差异。每个CM板加10 mL灭菌蒸馏水, 用灭菌毛笔轻刷菌落表面, 将孢子洗落

水中, 用三层灭菌擦镜纸过滤孢子悬浮液, 每个处理设3个重复, 用血球计数板统计孢子浓度, 计算并比较各菌株产孢量。

2 结果与分析

2.1 转化子的筛选与遗传稳定性

随机挑取继代培养5代并能发出相应荧光的pHMGA、pHMR1、pKD9-mCherry-H2B部分转化子进行PCR验证(图2)。结果显示, 所有转化子中均可扩增获得一条约585 bp的片段, 与从pHMGA、pHMR1、pKD9-mCherry-H2B质粒(阳性对照)中扩增出来的潮霉素抗性基因片段大小相同。另外, FON-HMGA转化子可以扩增出一条约502 bp的片段, 与从pHMGA质粒(阳性对照)中扩增出来的*GFP*片段大小相同, 同样FON-HMR1、FON-mCherry-H2B转化子可以扩增出一条368 bp的片段, 与从pHMR1、pKD9-mCherry-H2B质粒(阳性对照)中扩增出来的*DsRED*和*mCherry*片段大小相同, 而以未转化的FON基因组DNA(阴性对照)为模板时, 无扩增



随机挑选继代培养5代的FON-HMGA(1-1~1-3)、FON-HMR1(2-1~2-3)、FON-mCherry-H2B(3-1~3-3)荧光转化子各3株, PCR扩增检测*HPH*(引物HPH52/HPH34)、*GFP*(引物GFP-CHK1/GFP-CHK2)、*DsRED*(引物RED1/RED2)和*mCherry*(引物RED1/RED2)片段。FON为未转化对照; positive为相应的pHMGA、pHMR1、pKD9-mCherry-H2B质粒作为阳性对照; MK: marker III。

The randomly selected FON-HMGA (1-1, 1-2, 1-3), FON-HMR1 (2-1, 2-2, 2-3) and FON-mCherry-H2B (3-1, 3-2, 3-3) transformants after five rounds of sub-cultivation, three for each, were checked by PCR amplification with the primer pairs HPH52/HPH34, GFP-CHK1/GFP-CHK2 and RED1/RED2 to detect *HPH*, *GFP*, *DsRED* and *mCherry* fragments respectively. FON, the Wild-type strain; positive, the positive controls with the plasmids pHMGA, pHMR1, and pKD9-mCherry-H2B as templates; MK: marker III.

图2 FON荧光转化子的PCR验证

Fig.2 Confirmation of the FON fluorescent transformants using PCR amplification

条带。结果表明,在所检测的转化子中,潮霉素抗性基因和对应的荧光标记基因均整合入相应转化子的基因组,并且继代培养稳定。

为了检验外源基因的导入对转化子表型的影响,我们对转化子的菌落形态、产孢量进行观察。同样地,我们随机挑选继代培养5代的转化子,测量菌落直径和产孢量,与野生型菌株FON进行比较(图3)。结果显示,各参试转化子的菌落形态、生长速度、产孢量均与野生型无明显差异,符合我们的预期。

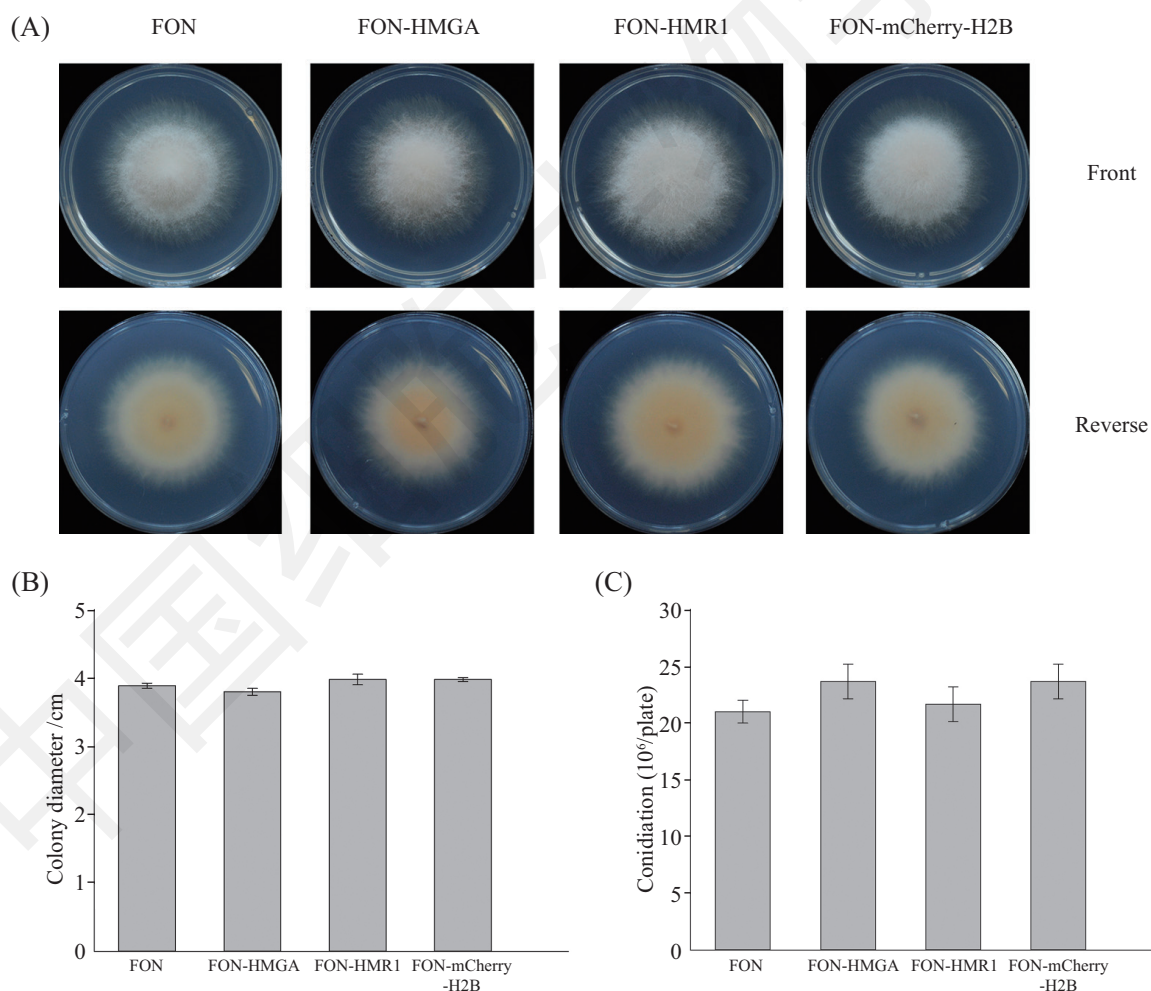
2.2 细胞核的mCherry荧光定位

在激光共聚焦显微镜下,观察FON-mCherry-H2B转化子。可见,在H3启动子的作用下,mCherry-H2B融合蛋白呈现出高亮度的红色荧光,无论在菌丝还是孢子细胞中,红色荧光均可集中于细胞内部的圆形点上,点的位置和大小均符合细胞核定位的

特性(图4A)。同时,这些荧光点与DAPI染色形成的蓝色荧光点完全对应(图4B),表明荧光正确地定位于细胞核。多数菌丝细胞中含1个细胞核,部分细胞含2~3个细胞核甚至更多;孢子细胞含1~3个细胞核。

2.3 过氧化物酶体的GFP和DsRED荧光定位

在激光共聚焦显微镜下,观察FON-HMGA和FON-HMR1转化子。可见,在稻瘟病菌MPG1基因启动子的作用下,在孢子和菌丝中均能观察到GFP-PTS1的绿色荧光或DsRED-PTS1的红色荧光表达。荧光呈小点状分布,大小0.2~1.0 μm ,分布于细胞内部,与真菌过氧化物酶体的位置和大小一致(图5A和图5B)。同时,转化子细胞中荧光点的数量在脂类物质的诱导下可明显增加。同一转化子生长在CM培养基上,每个菌丝细胞中的荧光点个数为 6 ± 3 个,而在脂类培养基上,每个细胞中荧光点的个数可达

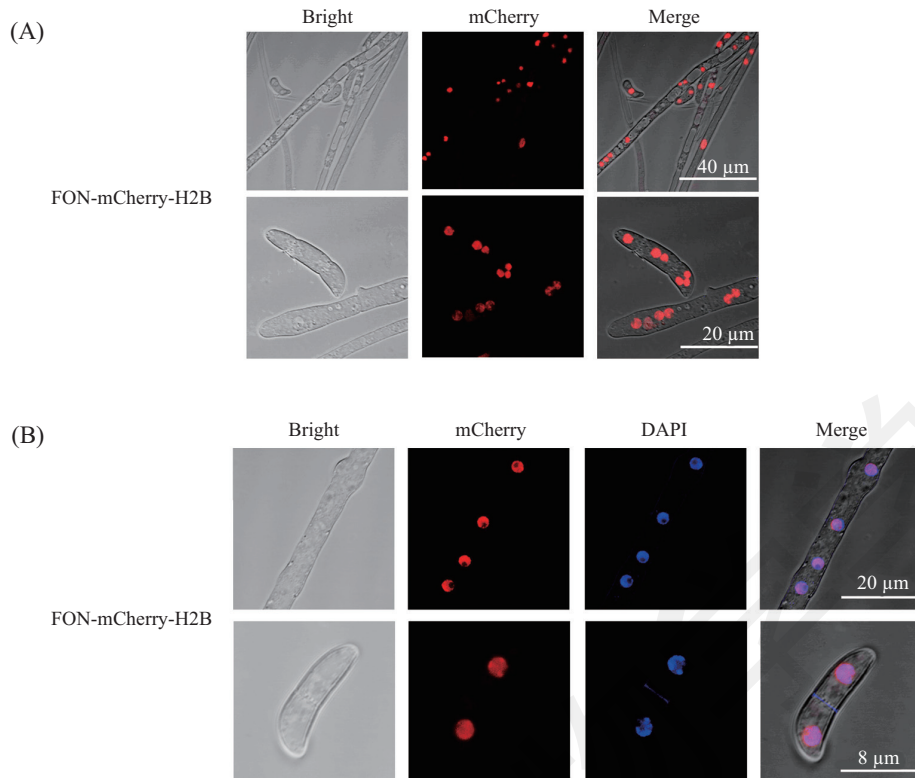


A: CM上生长3天的转化子菌落; B: CM上生长3天的转化子菌落直径; C: CM上生长3天的转化子产孢量。

A: colonies of the FON wide type and transformants cultured on CM for 3 days; B: colonial dimeters of the strains cultured on CM for 3 days; C: conidiation of the strains cultured on CM for 3 days.

图3 转化子的菌落形态、生长速度与产孢量

Fig.3 Colonial morphology, radial growth and conidiation of the transformants

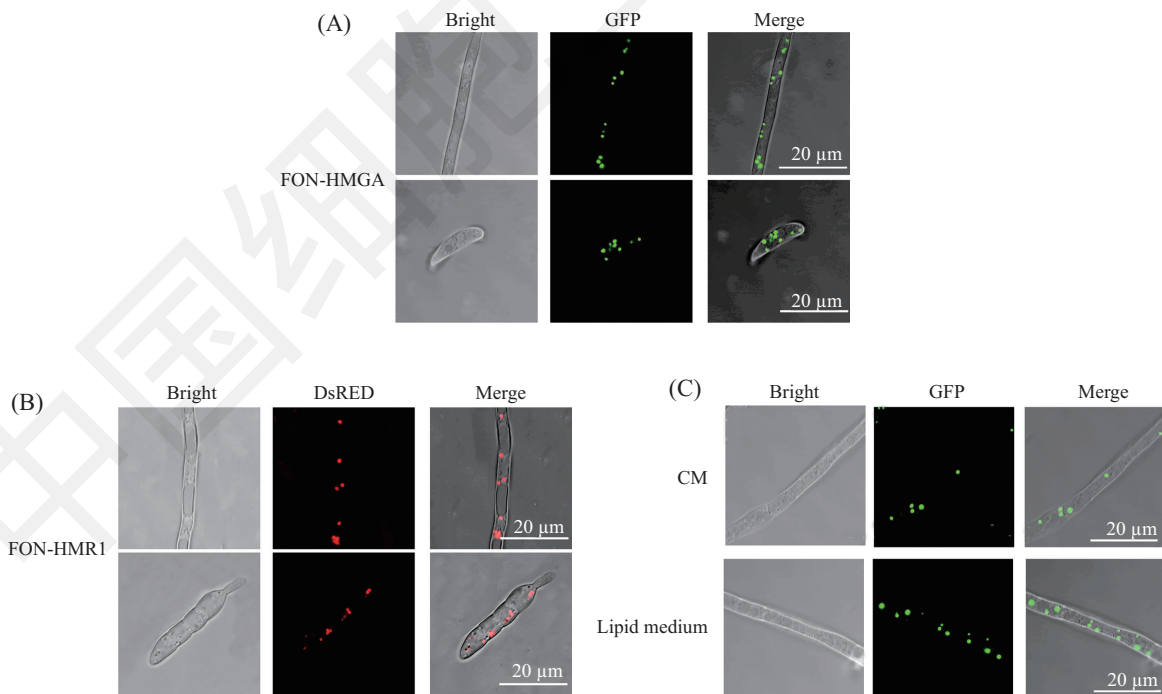


A: 菌丝和孢子中mCherry标记的细胞核; B: 细胞核mCherry荧光与DAPI共定位。

A: mCherry-labeled nuclei in hyphae and spores; B: co-localization of mCherry and DAPI in nuclei.

图4 FON细胞核的mCherry荧光定位

Fig.4 Fluorescent labeling of the nuclei in FON with mCherry



A: 菌丝和孢子中GFP标记的过氧化物酶体; B: 菌丝和孢子中DsRED标记的过氧化物酶体; C: 过氧化物酶体数量受脂类物质诱导增殖。

A: GFP-labeled peroxisomes in hyphae and spores; B: DsRED-labeled peroxisomes in hyphae and spores; C: the number of peroxisomes is increased upon induction of lipids.

图5 FON过氧化物酶体的GFP和DsRED荧光标记

Fig.5 Fluorescent labeling of the peroxisomes in FON with GFP and DsRED

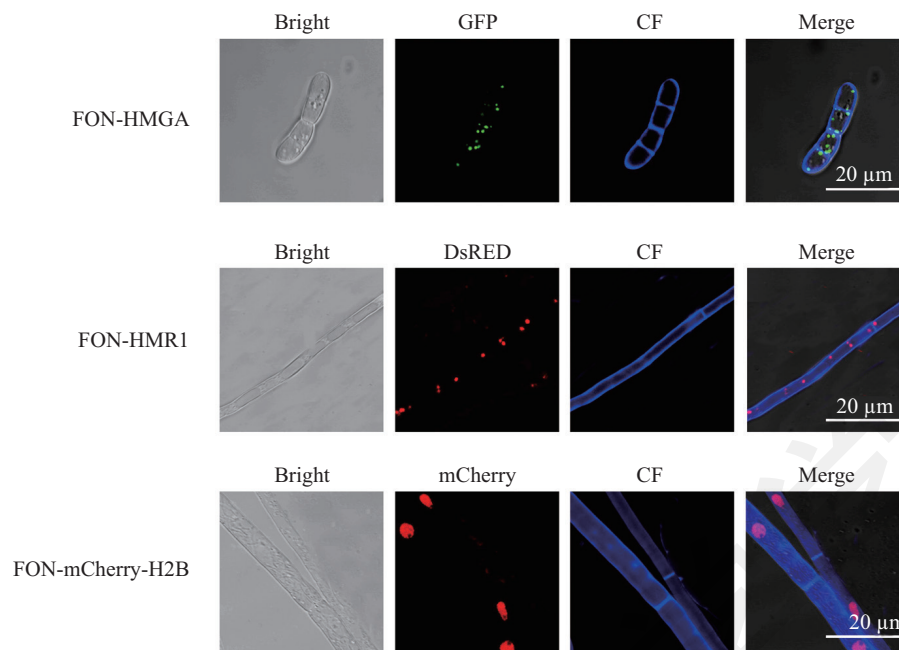


图6 卡氏白染色与荧光蛋白的共定位

Fig.6 Co-localization of Calcofluor white and fluorescent proteins

15±4个。符合过氧化物酶体可被脂类物质的诱导增殖的特点(图5C)。结果表明, GFP-PTS1和Ds-RED-PTS1均正确地定位于FON的过氧化物酶体上。

2.4 卡氏白染色与荧光蛋白的共定位观察

为了更清晰直观地观察不同细胞结构和细胞器的位置, 我们利用卡氏白对FON-HMGA、FON-HMR1、FON-mCherry-H2B 3种转化子的细胞壁染色, 进行共定位观察(图6)。在共聚焦显微镜下, 卡氏白(CF)染色发出的蓝色荧光与荧光蛋白发出的红色或绿色荧光, 并无相互干扰, 蓝色荧光位于菌丝或者孢子的细胞壁, 清晰地勾勒出细胞轮廓, 而绿色或红色荧光则位于细胞内相应的位置, 进一步确定荧光蛋白在过氧化物酶体和细胞核中的正确定位。

3 讨论

利用荧光蛋白对菌株进行标记, 从而追踪菌株自身的生长、发育以及致病性, 是植物病原真菌和动物病原真菌中一种有效的方法。同时, 荧光蛋白也被广泛应用于研究基因的时空表达以及蛋白的细胞和亚细胞定位。目前, 已有多种不同的荧光蛋白在脉孢霉、稻瘟病菌等真菌中得到应用^[22]。在FON中, GFP的应用已有报道^[23], 但红色荧光蛋白(DsRED或mCherry)的应用和利用荧光蛋白进行细胞器标记的研究尚不多见。本研究中, 我们成功实

现了对FON细胞核的红色荧光标记和过氧化物酶体的红色和绿色荧光标记。转化子中, GFP、DsRED和mCherry高丰度表达, 荧光亮度高、分散性好, 能够稳定遗传。荧光的亮度和精细度都足以对FON细胞核和过氧化物酶体的位置、大小、移动等进行标记。细胞核的数目以及核的分裂、移动和降解等动态过程是真菌发育生物学研究的重要内容之一^[24]。真菌有性生殖和准性生殖过程中, 都有特别的细胞核分裂、融合和降解等动态变化^[25]。在植物病原真菌侵染寄主的过程中, 也存在细胞核分裂和降解过程, 这个过程对致病性至关重要^[26]。过氧化物酶体是进行能量代谢的重要细胞器, 能够根据自身代谢的需要进行增殖和降解。研究表明, 过氧化物酶体和过氧化物酶体形成相关基因(*PEX*基因)在多种植物病原真菌以及人类病原真菌隐球酵母菌的致病过程中起着至关重要的作用。但至目前, FON过氧化物酶体的形成过程、相关基因以及与致病性的关系, 尚无报道。本研究对FON细胞核的mCherry荧光标记和过氧化物酶体的GFP和DsRED荧光标记, 为进一步研究该菌的细胞和细胞核发育过程、过氧化物酶体动态以及相关基因在病菌侵染过程中的作用提供了重要工具。

选择真菌蛋白表达的合适启动子是进行荧光蛋白标记的基础。目前丝状真菌中常用的启动子有

构巢曲霉的trpC和GPD1等通用启动子, 这些启动子往往是组成性表达的, 在多种真菌中均有较好的活性, 因此被广泛用于表达抗性标记基因和荧光蛋白。组蛋白H3被认为是一种组成型高表达的蛋白^[18,27]。稻瘟病菌H3启动子可实现荧光蛋白在稻瘟病菌中的高效表达^[18]。我们的结果显示, 在稻瘟病菌H3启动子控制下, FON-mCherry-H2B转化子的孢子、菌丝中荧光都很强, 表明稻瘟病菌H3启动子可在FON中被利用。稻瘟病菌MPG1基因编码一种疏水蛋白, 分布于菌丝和孢子表面以维持菌体表面的疏水性^[16]。MPG1基因在稻瘟病菌菌丝、孢子和附着胞中高丰度表达, 对病菌附着胞形成和侵染至关重要, 被看作是一个参与稻瘟病菌附着胞形成和致病性的特异基因。此前我们发现, MPG1启动子在启动稻瘟病菌中的荧光蛋白表达和蛋白定位过程中, 具有比GPD1和trpC更高的活性^[28]。本研究表明, 稻瘟病菌MPG1启动子在FON菌丝和孢子中也能够高表达^[27], 表达强度与稻瘟病菌H3启动子相当, 满足真菌细胞器荧光定位观测的需要。这些结果, 为发掘更多的真菌启动子用于真菌蛋白表达的研究和利用提供了参考。

我们还将荧光蛋白定位与化学染色相结合。DAPI对细胞核的染色能够和mCherry荧光蛋白标记较好地共定位; 而借助卡氏白对细胞壁的荧光染色, 在荧光显微镜下能清楚地分辨细胞轮廓与各个细胞器。此外, 我们获得的转化子, 菌落形态、生长速度、产孢量等性状与野生型均无明显差异, 说明在大多数的转化子中, 转化过程本身以及潮霉素基因和融合蛋白基因的表达, 对转化子的生长发育并没有明显影响, 这样的转化子可用于进一步的分子生物学研究。本研究为利用不同荧光蛋白和荧光染料对FON进行组织定位、蛋白定位和蛋白共定位提供了重要借鉴, 为细胞及亚细胞结构、基因功能以及蛋白互作的研究提供了重要的工具。

参考文献 (References)

- [1] 郭树清, 陈新娟. 西瓜枯萎病的识别与综合防治[J]. 长江蔬菜 (GUO S Q, CHEN X J. Identification and comprehensive control of watermelon blight disease [J]. J Changjiang Vegetables), 2019, 13: 57-8.
- [2] 黄春艳, 卜元卿, 单正军. 西瓜连作病害机理及生物防治研究进展[J]. 生态学杂志 (HUANG C Y, PIAO Y Q, SHAN Z J. Research progress on the mechanism and biological control of watermelon disease in continuous cropping [J]. Chin J Ecol), 2016, 35(6): 1670-6.
- [3] MIGUEL A, MAROTO J V, SAN BAUTISTA A, et al. The grafting of triploid watermelon is an advantageous alternative to soil fumigation by methyl bromide for control of *Fusarium* wilt [J]. Sci Hortic, 2004, 103(1): 9-17.
- [4] MARTYN R D, NETZER D. Resistance to races 0, 1, and 2 of *Fusarium* wilt of watermelon in *Citrullus* sp. PI-296341-FR [J]. Hortscience, 1991, 26(4): 429-32.
- [5] ZHOU X G, EVERTS K L, BRUTON B D. Race 3, a new and highly virulent race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing *Fusarium* wilt in watermelon [J]. Plant Dis, 2010, 94(1): 92-8.
- [6] WU C Z, XU F, GAO Y L, et al. Application of fluorescent labeling technique in the research of biology and medicine [J]. Chongqing Univ Technol, 2014, 5: 55-62.
- [7] ALABOUVETTE C, COUTEAUDIER Y. Biological control of *Fusarium* wilts with nonpathogenic fusaria [J]. Biol Control Plant Dis, 1992, doi: 10.1007/978-1-4757-9468-7_58.
- [8] MATZ M V, FRADKOV A F, LABAS Y A, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(10): 969.
- [9] MIKKELSEN L, SARROCCO S, LÜBECK M, et al. Expression of the red fluorescent protein DsRed-express in filamentous ascomycete fungi [J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 223: 135-9.
- [10] SHANER N C, CAMPBELL R E, STEINBACH P A, et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(12): 1567-72.
- [11] 许雅苹, 郑晓辉, 房纯正, 等. DAPI染色法在流式细胞术中去除死细胞影响的探讨[J]. 现代生物医学进展 (XU Y P, ZHENG X H, FANG C Z, et al. A methodology study on elimination the influence of dead cells stained with DAPI [J]. Prog Modern Biomed), 2019, 19(9): 1660-4+1674.
- [12] NAGATA T, TAKEBE I. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts [J]. Planta, 1970, 92(4): 301-8.
- [13] WANDERS R J A, WATERHAM H R. Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1763(12): 1707-20.
- [14] 高飞雁, 李玲, 王教瑜, 等. PEX基因在过氧化物酶体形成及真菌致病性中的作用[J]. 遗传 (GAO F Y, LI L, WANG J Y, et al. The functions of PEX genes in peroxisome biogenesis and pathogenicity in phytopathogenic fungi [J]. Hereditas), 2017, 39(10): 908-17.
- [15] FREITAG M, HICKEY P C, RAJU N B, et al. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa* [J]. Fungal Genet Biol, 2004, 41(10): 897-910.
- [16] TALBOT N J, EBBOLE D J, HAMER J E. Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* [J]. Plant Cell, 1993, 5(11): 1575-90.
- [17] LI L, WANG J, CHEN H, et al. Pex14/17, a filamentous fungus-specific peroxin, is required for the import of peroxisomal matrix proteins and full virulence of *Magnaporthe oryzae* [J]. Mol Plant Pathol, 2016, 18(9): 1238-52.
- [18] 李海娇, 卢建平, 刘小红, 等. 适用于稻瘟病菌基因敲除、过表达和荧光融合蛋白表达载体的构建和使用[J]. 农业生物技术学报 (LI H J, LU J P, LIU X H, et al. Vectors building and usage for gene knockout, protein expression and fluorescent fusion protein in the rice blast fungus [J]. Chin J Agric Biotechnol), 2012, 20(01): 94-104.
- [19] RHO H S, KANG S, LEE Y H. *Agrobacterium tumefaciens*

- mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea* [J]. Mol Cells, 2001, 12(3): 407-11.
- [20] 王教瑜, 杜新法, 柴荣耀, 等. 丝状真菌目标基因替换过程中的策略与方法[J]. 遗传(WANG J Y, DU X F, CHAI R Y, et al. Strategies of targeted gene replacement in filamentous fungi [J]. Hereditas), 2007, 29(7): 898-904.
- [21] 周庆新. 丝状真菌遗传转化系统的建立[D]. 山东农业大学, 2007.
- [22] 郭晓宇, 李玲, 董波, 等. 利用荧光蛋白标记研究稻瘟病菌有性世代的细胞结构[J]. 中国细胞生物学学报(GUO X Y, LI L, DONG B, et al. Lighting the cellular structures of sexual generation in *Magnaporthe oryzae* with fluorescent proteins and fluorescent dyes [J]. Chin J Cell Biol), 2018, 40(7): 1138-45.
- [23] 李春强, 梁慧施, 夏亦芥, 等. GFP标记的尖孢镰刀菌西瓜专化型侵染西瓜过程观察[J]. 热带作物学报(LI C Q, LIANG H S, XIA Y J, et al. Observation of the infection process of watermelon by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* using the GFP marker [J]. Chin J Trop Crop), 2011, 32(10): 1935-9.
- [24] SUELMANN R, SIEVERS N, FISCHER R. Nuclear traffic in fungal hyphae: *in vivo* study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans* [J]. Mol Microbiol, 1997, 25(4): 757-69.
- [25] 王南, 徐孝华. 尖孢镰刀菌四个专化型细胞核的初步研究[J]. 真菌学报(WANG N, XU X H. Preliminary study on four specialized nuclei of *Fusarium oxysporum* [J]. Mycosystema), 1990, 4: 312-8+338.
- [26] CHEN A, XIE Q, LIN Y, et al. Septins are involved in nuclear division, morphogenesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum* [J]. Fungal Genet Biol, 2016, 94: 79-87.
- [27] XIAO C W, LI L, LAO L M, et al. Application of the red fluorescent protein mCherry in mycelial labeling and organelle tracing in the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2018, 365(6): fny006.
- [28] WANG J Y, WU X Y, ZHANG Z, et al. Fluorescent co-localization of PTS1 and PTS2 and its application in analysis of the gene function and the peroxisomal dynamic in *Magnaporthe oryzae* [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2008, 9(10): 802-10.