

棉花黄萎病菌 T-DNA 插入突变体功能基因及生物学性状分析*

蔡 节, 罗秀媚, 陈姗姗, 谢成建, 杨星勇

(重庆师范大学 植物抗病实验室 重庆市植物逆境生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】分析棉花黄萎病致病菌相关基因的功能揭示其中致病机制。【方法】通过 ATMT 法构建了大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 650 个 T-DNA 插入突变体。利用 hiTAIL-PCR 技术获得 17 株 T-DNA 插入体侧翼基因序列, 通过 blast 比对分析表明, 其中 16 个基因序列编码酶或蛋白。【结果】突变体的生物学性状与野生型菌株 Vd991 相比, 出现黄色菌丝型 2 株, 中间菌丝型 6 株; 部分突变体在生长速率(7 株)、产孢量(14 株)和粗毒素产量(4 株)上都发生了具有统计学意义的变化($p < 0.05$); 致病力测定表明, 9 株突变体的致病力较野生型有所降低, 在 $p < 0.05$ 水平具有统计学意义。【结论】该研究为大丽轮枝菌致病基因的筛选和鉴定提供了理论基础。

关键词:棉花黄萎病; 大丽轮枝菌; T-DNA 插入突变; 生物学性状; 基因功能

中图分类号: Q939.95

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2017)03-0107-07

棉花(*Gossypium hirsutum*)是广泛栽培的具有重要经济价值纤维植物。棉花黄萎病(*Verticillium wilt*)是由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)引起的一种土传微管束病害^[1], 代表症状是叶卷曲、坏死和脱落, 微管组织变色, 乃至整株枯萎^[2]。中国目前大约有 2×10^6 hm² 的棉花遭受黄萎病侵袭, 由此导致纤维品质降低和减产, 损失可高达总产量的 30%^[3]。黄萎病已成为棉花生产发展的严重障碍和隐患, 该病的发生面积和发病程度依然在持续增加; 加上该病的致病菌是一个多菌系组成的复合群体, 变异频繁, 故目前尚没有发现有关棉花黄萎病防治或控制的有效方法^[4-5]; 另外棉花主要栽培品种遗传基础狭窄, 抗黄萎病能力较差, 而其中陆地棉缺乏高抗或免疫的抗原材料, 这使得传统的育种手段难以获得高抗黄萎病品种^[4]。因此, 探索大丽轮枝菌致病因子, 探究致病分子机制, 分析它和寄主植物免疫途径的互作机制等方面的基础研究, 可以为更有效地控制棉花黄萎病提供科学依据和新的途径。

农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)是一种革兰氏阴性菌, 它能将 Ti 质粒上的一段 T-DNA 转移并整合到宿主基因组的随机位点上^[6]。农杆菌介导的遗传转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)常被用于研究植物和真菌的基因转移和标志基因^[7]。与 CaCl₂/PEG 介导的原生质体转化法(CaCl₂/PEG-protoplast transformation)、醋酸锂法(Lithium acetate treatment)、电击转化法(Electroporation)、基因枪转化法(Biolistic transformation)等方法相比, ATMT 是一种主动的生物转化系统, 转化受体范围广, 能转化完整细胞, 如分生孢子、菌丝甚至子实体, 从而避免原生质体制备的繁琐过程^[6,8-9]。ATMT 具有转化效率高的特点, 如利用 ATMT 转化泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)的原生质体或分生孢子转化效率比 PEG 介导的原生质体转化方法要高 600 倍^[8]; 而在有关巨曲霉(*Aspergillus giganteus*) AFP 蛋白基因转化实验中发现, 与其他方法相比, 农杆菌介导法将转化效率提高了 140 倍^[10]。同时, ATMT 的 T-DNA 随机插入多为单拷贝, 如稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)转化中有 60% 的单拷贝转化子^[11]; 而在对泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)的研究中也证实 ATMT 转化子多为 T-DNA 单拷贝插入^[8]。再者, ATMT 转化子的性状稳定, 如红曲霉菌(*Monascus purpureus*)的 ATMT 转化子经过 4 轮孢子培养及筛选后, 98% 的突变子仍然表现出潮霉素抗性, 而 PEG 介导原生质体转化子只有 60% 表现抗性^[12]; 稻根霉菌(*Rhizopus oryzae*)的转化子 100% 能进行稳定的有丝分裂, 而利用原生质体-PEG 法得到的转化子只有 0.01%~0.5% 能进行稳定的有丝分裂^[13]。此外, T-DNA 以非特异性序列方式整合到宿主基因组中而容易产生突变体; 且分离 T-DNA 标记基因序列的几种方法也比较成熟。因此,

* 收稿日期: 2016-05-09 修回日期: 2017-03-23 网络出版时间: 2017-05-02 17:24

资助项目: 国家自然科学基金(No.40103112); 重庆市教委项目(No.KJ1500324)

第一作者简介: 蔡节, 女, 研究方向为微生物学, E-mail: 513705582@qq.com; 通信作者: 杨星勇, 教授, E-mail: tobp03@gmail.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20170502.1724.022.html>

ATMT 是随机插入突变的一个有效工具。近些年来,应用该方法已构建了在许多重要病原真菌 T-DNA 随机插入突变体库,如新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)^[14]和盾壳霉(*Coniothyrium minitans*)^[15]。

虽然随着大丽轮枝菌基因组测序的完成,与致病相关的基因如 *VdNEP*^[2], *VMK1*^[16], *VdGARP1*^[17], *VdSNF1*^[18] 等不断被发现和对它进行了深入研究,但棉花黄萎病菌的致病机理目前仍然不清楚,需要更多的致病相关基因被进一步研究。因此,本研究在前期工作基础上,以强致病菌株 Vd991 为材料,构建了 T-DNA 突变体库,得到了 17 个转化子,在此基础上对它进行生物学性状分析和致病性测定筛选同致病相关的突变体,为后续克隆相关致病基因并研究基因功能提供材料,并为大丽轮枝菌致病机理研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

棉花黄萎病菌菌株 Vd991 由西南大学植物保护学院邓先明教授惠赠,陆地棉渝棉 1 号种子由西南大学农学与生物科技学院张正圣教授惠赠。克隆载体 pMD19-T vector 购自宝生物(TaKaRa)公司;用于基因克隆和载体构建的大肠杆菌菌株 DH5 α 、用于介导大丽轮枝菌的遗传转化农杆菌菌株 AGL-1 以及质粒 PGGK 由笔者所在实验室保存。

实验中使用的培养基有 PDA/PDB 培养基、LB 液体/固体培养基、YEB 液体/固体培养基、IM 液体/固体培养基;主要试剂有 GenView 公司出品的氨苄青霉素(Ampicillin)、卡那霉素(Kanamycin)、头孢霉素(Cefotaxime Sodium)、链霉素(Streptomycin)、乙酰丁香酮(Acetosyringone)和 Roche 公司出品的潮霉素 B(Hygromycin B),下文分别用 Amp, Kan, Cef, SM, AS, Hph 表示。

1.2 方法

1.2.1 T-DNA 插入突变体的获得与鉴定 将含 PGGK 的农杆菌菌株 AGL-1 于 YEB(含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Kan)固体培养基上 28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养约 2 d;挑取单菌落于 YEB 液体培养基(含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Kan)中,于 28 $^{\circ}\text{C}$, 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养过夜(16~20 h),并调 $\text{OD}_{660 \text{ nm}}$ 值范围为 0.5~0.6;取 3 mL 菌体,5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,去上清,加入 2 mL IM 液体培养基(含 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS)重悬菌体,调节其中农杆菌菌体的 $\text{OD}_{660 \text{ nm}}$ 值在 0.15 左右;吸取 Vd991 分生孢子 1 mL 到 IM 液体培养基(含 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS)中,混匀后用血球计数板统计孢子数目,并将孢子悬液稀释到每毫升含 1×10^7 个孢子时备用;将灭菌的微孔滤膜平铺在固体 IM(含 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS)平板上;取上述制备好的农杆菌菌液和孢子悬液各 500 μL ,充分混匀后,取 150 μL 混合物均匀涂布在上一步准备的平板上;平板倒置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 48 h 后,将共培养物和微孔滤膜一起转移到 PDA 培养基(含 125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ SM 和 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hph)上,继续倒置并以 25 $^{\circ}\text{C}$ 进行培养;培养 5~7 d 后,用手术刀将白色抗性菌落切取到新鲜的 PDA 培养基(含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hph)上继续筛选培养。

切取大丽轮枝菌少量菌丝于 PDB 培养基中,于 25 $^{\circ}\text{C}$, 150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养 5~7 d 后,吸取适量菌液到 1.5 mL EP 管中,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,倒掉上清(可根据需要重复收集);利用 CTAB 法^[19]提取突变体基因组 DNA,根据质粒 PGGK 潮霉素基因的序列设计两条验证引物 HPH-F(5'-ATGCCTGAACCTACCGCGAC-3')和 HPH-R(5'-TTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCT-3'),对随机筛选得到的突变菌株进行 PCR 分子验证。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 34 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。挑选阳性的突变菌株(标记为 T0 代)进行液体培养和平板继代培养,转接 5 次,前 4 次培养基不加抗生素,最后 1 次培养基中加质量浓度为 30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Hph,将最后 1 轮的孢子悬浮液点接到 PDA 平板上(含 Hph)。观察各平板上后代(标记为 T5)的生长情况,根据所有菌株均正常生长且彼此之间表型相同或大致相同判断该转化子的遗传稳定性,以 Vd991 为对照。

采用 hiTAIL-PCR 方法^[20],设计 4 条简并引物 AP1, AP2, AP3 和 AP4。根据二元载体 PGGK 的 T-DNA 区域设计了 3 条特异性引物 Sp1, Sp2 和 Sp3。引物序列见表 1。反应程序和体系按照 Genome Walking 试剂盒进行。将利用 hiTAIL-PCR 方法扩增得到的 T-DNA 插入侧翼序列特异性片段进行切胶,用 OMEGA 胶回收试剂盒进行 DNA 的纯化回收,再连接到 A-T 克隆载体 pMD19-T 上,测序。

测序结果用 DNASTar 软件与 T-DNA 边界序列进行比对^[21],即获得 T-DNA 插入位点的侧翼序列。将获得的侧翼序列进一步在已经公布的大丽轮枝菌数据库中进行 blastn (Nucleotide query/Nucleotide database),寻找 T-DNA 插入位点的侧翼序列在大丽轮枝菌 VdLS. 17 数据库中相同或者同源的基因,以此推断 T-DNA 标签基因的可能功能。

1.2.2 菌株的活化和培养 将 Vd991 和各突变体于 PDA 培养基上,25 ℃ 恒温培养 6 d 以活化菌株。挑取直径为 5 mm 的菌丝块于 PDB 培养基中,28 ℃,200 r·min⁻¹ 摇床培养 6 d,4 层擦镜纸过滤,获得菌丝和孢子悬浮液。镜检并统计孢子数,用无菌水调整至每毫升含 1×10⁷ 个孢子,用于接种和测定生物学性状。利用 CTAB 法^[19]提取菌丝基因组 DNA。

1.2.3 T-DNA 突变体生物学性状测定 1) 菌落形态观察和生长速率测定。以 Vd991 为对照,吸取 3 μL 每毫升含 1×10⁷ 个孢子的悬浮液,点接于 PDA 培养基中央,25 ℃ 恒温培养 10 d,每个菌株重复 3 次,记录菌落生长形态。5 d 后采用十字交叉法,隔日测量 1 次菌落直径,共 11 d;计算菌落的生长速率。2) 产孢量和粗毒素的含量测定。以 Vd991 为对照,吸取 100 μL 孢子悬浮液,接种于 40 mL PDB 培养基中;28 ℃,200 r·min⁻¹ 摇床培养 6 d,镜检并统计孢子数。继续摇床培养 14 d 后,13 000 r·min⁻¹ 离心菌液 30 min,取上清液;利用微量分光光度计测定其中蛋白质的质量浓度作为粗毒素质量浓度。每个菌株重复 3 次。

1.2.4 致病性测定 1) 棉种处理。选取颗粒饱满的陆地棉渝棉 1 号种子种植于直径为 9 cm 的花盆(基质为灭菌 Pindstrup substrate)中,并将花盆放置在 25 ℃、光照 16 h 的人工气候培养箱内。棉花幼苗长至 6 叶时用于致病实验。2) 致病实验。突变菌株致病性测定参考彭珊等人^[22]的方法并略加改进。将 10 mL 悬浮液(每毫升含 1×10⁷ 个孢子)倒入上述花盆中。每个突变株处理 15 株,重复 3 次。以 Vd991 菌株作为对照,用病情指数^[22]描述突变菌株致病力,具体计算公式为:

病情指数 =
$$\frac{\sum(\text{各级病植株总数} \times \text{发病级别})}{\text{总株数} \times \text{最高发病级数}} \times 100。$$

2 结果

2.1 T-DNA 突变体的筛选

以 Vd991 菌株为强毒力菌株获得 650 个棉花黄萎病菌 T-DNA 插入突变体。然后通过 hiTAIL-PCR 方法,同时与大丽轮枝菌 VdLS. 17 的基因组(http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae/MultiHome.html)进行比对,获得了 17 株突变体 T-DNA 插入侧翼序列基因的相关信息(表 2)。通过对所获得的 17 个侧翼序列之间相互比对,发现 17 个突变体间没有同源性;除突变株 Vd.M. 340 插入到基因间隔区外,其他突变体均插入到了下游基因。同时,突变体 T-DNA 除在第 4,第 8 染色体上没有分布外,在其余几条染色体上均有分布,故 T-DNA 为随机插入。

表 1 hiTAIL-PCR 引物

Tab. 1 Primer used in hiTAIL-PCR

引物名称	引物序列 (5'~3')
AP1	TGNCNAGGANAASAGA
AP2	AGNAAGWANCAWWAGG
AP3	CAWCWACNGGANSAGAA
AP4	TCSTNCGCAANTWGGA
Sp1	TGCTCCTCTTCTTTACTCTG
Sp2	CTACAGGACACACATTTCATC
Sp3	AATGCTCCGTAACACCCAAT

表 2 T-DNA 侧翼序列与大丽轮枝菌 VdLS. 17 的基因组 blast 比对

Tab. 2 Blast results between T-DNA flanking sequences to genomes of VdLS. 17

突变体	插入位点	染色体	一致性	基因注释
Vd.M. 108	VDAG_08873.1	Chr 5	301/301	IDC1 蛋白
Vd.M. 112	VDAG_04166.1	Chr 1	463/457	保守假定蛋白
Vd.M. 340	基因间区域	Chr 2	263/256	无
Vd.M. 343	VDAG_03738.1	Chr 3	359/354	翻译控制肿瘤蛋白
Vd.M. 369	VDAG_02746.1	Chr 3	286/283	保守假定蛋白
Vd.M. 370	VDAG_03661.1	Chr 3	406/403	过氧化氢酶 1
Vd.M. 376	VDAG_09589.1	Chr 7	250/249	乙酰乙酰辅酶 A 合成酶
Vd.M. 389	VDAG_09471.1	Chr 7	375/372	核孔蛋白 Pom152
Vd.M. 392	VDAG_08215.1	Chr6	285/277	保守假定蛋白
Vd.M. 394	VDAG_10094.1	Chr 1	327/327	假定蛋白
Vd.M. 443	VDAG_02635.1	Chr 3	289/286	假定蛋白
Vd.M. 473	VDAG_04251.1	Chr 1	465/464	核仁复合蛋白
Vd.M. 476	VDAG_00518.1	Chr 2	41/41	动力蛋白重链
Vd.M. 491	VDAG_03598.1	Chr 3	759/747	pfs 蛋白
Vd.M. 525	VDAG_08521.1	Chr 2	234/231	真菌特异性转录因子结构域蛋白
Vd.M. 535	VDAG_03363.1	Chr 6	752/749	谷氨酸羧肽酶
Vd.M. 538	VDAG_03945.1	Chr 3	218/218	Rpb7 结合蛋白 seb1

2.2 T-DNA 突变体生物学特征

2.2.1 菌落形态观察 和 Vd991 相比,17 株突变体在 PDA 培养基上的培养形态多样,包括与 Vd991 生长形态一致的突变株,还有黄色菌丝型等突变菌株。其中 V991 菌丝型有 9 株,产生黑色素和菌丝,且黑色素包围着微菌核,占所分析的 53%;黄色菌丝型有 2 株,菌丝为黄色,不产生黑色素和微菌核,占所分析的 12%;中间菌丝型 6 株,产生少量微菌核且黑色素较浅,占所分析的 35%(图 1)。

2.2.2 生长速率测定 菌株在 PDA 平板上的生长速率(第 5 天到第 11 天)结果见表 3。多数突变体生长速率较 Vd991 变化不大。Vd991 的生长速率为 $(13.42\pm1.44)\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$;突变株 Vd.M.525 的生长速率最低,为 $(3.32\pm1.07)\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$;突变株 Vd.M.343 在所测 17 株突变体中生长速率最高,为 $(10.00\pm1.71)\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

2.2.3 产孢量测定 Vd991 在振荡培养 6 d 后的产孢量为每毫升 17.5×10^7 个,7 株突变体的产孢量比之有所增加,在 $p<0.01$ 水平有统计学意义,如突变株 Vd.M.538 产孢量为每毫升 50.5×10^7 个,与 Vd991 产孢量相比增加了 65.35%,两者差异具有统计学意义($p<0.01$);3 株突变体与 Vd991 相比产孢量有所下降,在 $p<0.01$ 水平有统计学意义,如突变株 Vd.M.376 产孢量为每毫升 3×10^7 个,与 Vd991 产孢量相比降低了 82.86%,两者差异具有统计学意义($p<0.01$);另有 3 株突变体与 Vd991 相比产孢量差异没有统计学意义(表 3)。

2.2.4 粗毒素测定 棉花黄萎病菌的致病毒素主要为胞外蛋白,故常以胞外蛋白作为粗毒素。Vd991 和 17 株突变体的粗毒素测定结果见表 3。Vd991 分泌的粗毒素质量浓度为 $18.52\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,而有 2 株突变体中粗毒素质量浓度与之相比有所升高,在 $p<0.01$ 水平有统计学意义;2 株突变体中粗毒素质量浓度与之相比有所下降,在 $p<0.05$ 水平有统计学意义;其余 13 株突变体中粗毒素质量浓度与之相比差异没有统计学意义。

2.3 致病力的测定

结果显示,突变株 Vd.M.443 的致病力与 Vd991 一致(表 3 和图中 A 和 B);有 2 株突变体与 Vd991 相比病情指数有所下降,并在 $p<0.01$ 水平有统计学意义(表 3 和图 2 中 A 和 D);7 株突变体与 Vd991 相比病情指数有所下

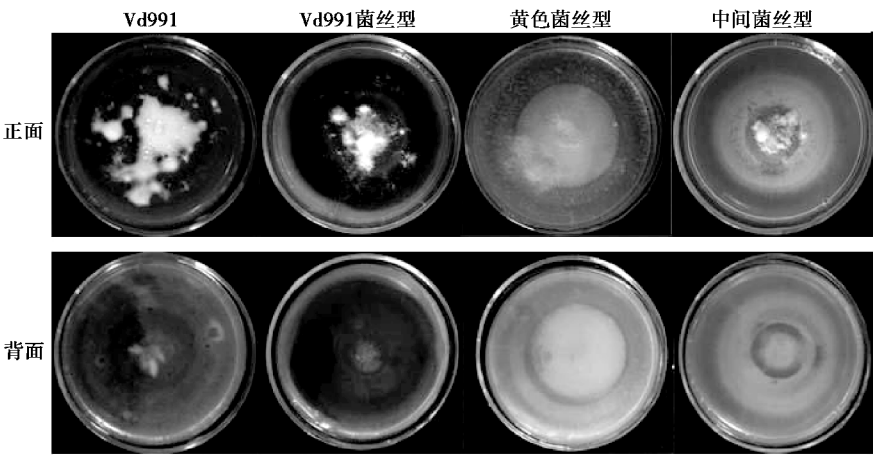


图 1 Vd991 和突变体在 PDA 培养基上菌落形态
Fig. 1 Colony morphology of Vd991 and mutants on PDA

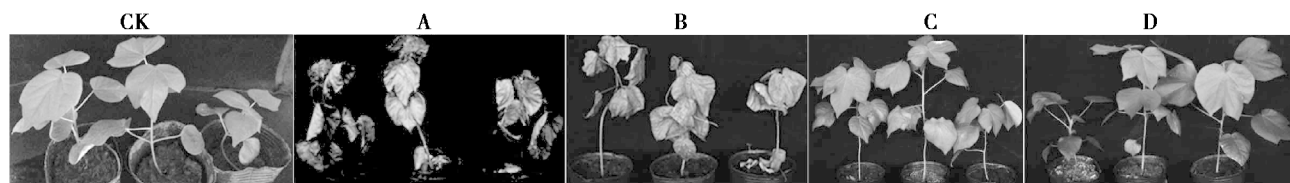
表 3 生物学性状分析与致病性测定

Tab. 3 Analysis of biological characteristics and pathogenicity assay

菌株编号	生长速率/ (mm · d ⁻¹)	产孢量/ (10 ⁷ 个 · mL ⁻¹)	粗毒素质量浓度/ (mg · mL ⁻¹)	病情指数
Vd991	13.42±1.44	17.50±0.73	18.52±1.00	100.00±0.00
Vd.M.108	9.62±0.55	40.50±0.76**	17.87±1.96	56.44±14.41*
Vd.M.112	9.44±1.51	3.50±0.21**	18.64±0.46	75.67±12.33
Vd.M.340	6.21±1.05*	19.50±1.60	17.72±1.11	61.89±9.26*
Vd.M.343	10.00±1.71	16.00±1.53	14.26±1.66	50.22±8.54**
Vd.M.369	7.21±1.26*	9.00±0.33**	18.74±1.24	81.44±6.71
Vd.M.370	6.88±1.10*	38.00±1.17**	18.12±0.52	41.81±6.77**
Vd.M.376	7.73±1.08*	3.00±0.17**	17.26±1.19	65.59±8.60*
Vd.M.389	8.67±1.16	24.00±1.33*	34.89±1.56**	64.78±11.41*
Vd.M.392	5.15±1.11*	20.50±1.36*	17.22±0.97	95.67±4.33
Vd.M.394	6.24±1.26*	15.00±0.73	18.24±0.62	80.11±6.83
Vd.M.443	9.95±1.51	13.00±0.73*	15.09±1.68	100.00±0.00
Vd.M.473	9.58±1.42	39.50±0.20**	13.97±1.62	61.56±10.14*
Vd.M.476	9.18±0.84	32.00±1.45**	10.81±1.50*	52.33±10.74*
Vd.M.491	6.64±2.16	30.50±1.26**	0.26±0.00**	97.33±2.67
Vd.M.525	3.32±1.07*	12.00±1.20*	18.82±1.54	48.22±11.54*
Vd.M.535	8.00±1.28	42.50±1.30**	18.34±1.75	93.00±7.00
Vd.M.538	8.60±2.18	50.50±0.76**	35.47±0.50**	94.67±5.33

注:表中数据用“平均值±标准差”表示,利用 SPSS 17.0 软件进行方差分析,
* 表示在 $p<0.05$ 水平有统计学意义,** 表示在 $p<0.01$ 水平有统计学意义。

降,并在 $p < 0.05$ 水平有统计学意义(表3和图2中A和C);其余9株突变体与Vd991相比病情指数差异无统计学意义。



注:CK-空白对照;A-感染Vd991后的发病情况;B-发病情况与Vd991一致;C-发病情况低于Vd991在 $p < 0.05$ 水平有统计学意义;D-发病情况低于Vd991在 $p < 0.01$ 水平有统计学意义。

图2 接菌后致病力的测定

Fig. 2 Pathogenicity assay after inoculation

3 讨论

棉花黄萎病是全世界具有相当严重破坏性的植物病害之一^[23]。对棉花黄萎病的控制较困难的原因主要在于该病原体的宿主范围广泛,且病原体特别是微菌核可以在土壤中存活多年^[24]。本研究构建了棉花黄萎病菌菌丝型菌株Vd991突变体库,鉴定了17个突变体,47%的突变体在菌丝颜色上产生了明显变化,53%的突变体与Vd991一致;一些突变体的致病力与Vd991相比有所下降,在 $p < 0.05$ 水平有统计学意义。生物学性状研究表明,与Vd991相比,多数突变体的生长速率、产孢量和粗毒素产量变化具有统计学意义($p < 0.05$)。上述结果也预示着棉花黄萎病菌侵染棉花的分子机制十分复杂。

通过对17株突变体致病力的分析可知,Vd.M. 112, Vd.M. 369, Vd.M. 392, Vd.M. 394, Vd.M. 443, Vd.M. 491, Vd.M. 535和Vd.M. 538的致病力与Vd991相比没有统计学意义上的差异,而Vd.M. 108, Vd.M. 340, Vd.M. 343, Vd.M. 370, Vd.M. 376, Vd.M. 389, Vd.M. 473, Vd.M. 476和Vd.M. 525的致病力与Vd991相比有所降低,且在 $p < 0.05$ 水平具有统计学意义。其中,部分与致病力相关的基因在其他真菌中有相关报道。Vd.M. 108中T-DNA插入位点的侧翼序列所在的IDC1蛋白基因(VDAG_08873.1),是盘菌(*Peziza*)的特异基因,在PaMpk1 MAP激酶核定位中参与PaNox1 NADPH氧化酶合成,而PaNox1 NADPH氧化酶在MAPK信号传导中起关键作用^[25]。研究者发现链霉菌(*Streptomyces lividans*)发现了乙酰乙酰CoA合成酶基因,即Vd.M. 376中的VDAG_09589.1基因,并提出该基因所编码蛋白在C-端延伸和N-端结构域间有新的相互作用,此结构在蛋白乙酰转移酶的识别中发挥重要作用^[26]。在链霉菌(*Streptomycetaceae*)中,乙酰乙酰CoA合成酶活性是由一个唯一域组织蛋白乙酰转移酶控制^[27]。Vd.M. 389中插入的突变基因VDAG_09471.1编码核孔蛋白Pom152,后者在酿酒酵母有丝分裂中起着重要作用^[28]。Vd.M. 370插入突变的VDAG_03661.1基因编码过氧化氢酶1,后者在免疫中发挥重要作用^[29]。Vd.M. 473的VDAG_04251.1基因编码核仁复合蛋白,该蛋白可能调控rDNA沉默和同源重组^[30]。Vd.M. 525侧翼序列所插入的VDAG_08521.1基因编码真菌特异性转录因子结构域蛋白,并且该突变体菌落黑色素较浅于Vd991,产孢量低于Vd991并在 $p < 0.05$ 水平有统计学意义;同时,笔者所在研究团队已通过定点突变验证VDAG_08521.1基因的缺失导致了大丽轮枝菌致病力丧失^[31]。

由于与致病力相关的其他基因在真菌中还未见报道,因此它们在棉花黄萎病菌中的功能有待进一步研究。Vd.M. 343中所插入的基因编码翻译控制肿瘤蛋白(Translationally controlled tumor protein, TCTP),TCTP是一种广泛保守的蛋白,可参与调节细胞增殖、凋亡、转化和氧化应激;TCTP与其他各种蛋白相互作用,而这些相互作用位点是潜在的药物靶标位点^[32]。TCTP基因的突变可导致Vd991致病力显著降低,而TCTP基因在植物和真菌基因组中也广泛存在^[33-34],它的功能值得深入探究。Vd.M. 476中插入的突变的VDAG_00518.1基因编码动力蛋白重链,而在 α 疱疹病毒中由1个基因编码,但该基因功能并不清楚^[35]。此外,从低致病力突变体的T-DNA插入位点分布来看,插入位点基因在染色体上的分布较广,其中Vd.M. 340的基因序列插入到了间隔区;因基因随机插入到功能基因的不同位置,故而使致病基因失活。

总之,利用强致病株Vd991获得T-DNA突变体,并从中筛选低致病力突变体和克隆验证突变基因功能,将为研究相关致病机理奠定重要的基础。

参考文献:

- [1] SAL'KOVA E G, GUSEVA N N. The role of pectolytic enzymes of the *Verticillium dahliae* fungus in the development of cotton wilt[J]. Doklady Akademii Nauk SSSR, 1965, 163(2): 515-522.
- [2] WANG J Y, CAI Y, GOU J Y, et al. VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4989-4995.
- [3] XU L, ZHU L F, TU L L, et al. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(15): 5607-5621.
- [4] 朱荷琴, 简桂良, 宋晓轩. 棉田黄萎病菌致病型群落结构研究[J]. 棉花学报, 2004(3): 147-151.
ZHU H Q, JIAN G L, SONG X X. Community structure of pathogenic type of *Verticillium dahliae* Kleb. in cotton field[J]. Journal of Cotton, 2004(3): 147-151.
- [5] BOLEK Y, EL-ZIK K M, PEPPER A E, et al. Mapping of verticillium wilt resistance genes in cotton[J]. Plant Science, 2013, 168(6): 1581-1590.
- [6] ZHANG Y H, LI G Q, HE D, et al. Efficient insertional mutagenesis system for the dimorphic pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* using *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 84(3): 418-422.
- [7] MACHIDA Y, YOSHIOKA Y. Mechanism of T-DNA integration into plant genomes and trial of plant gene targeting[J]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1992, 37(7): 1041-1046.
- [8] DE GROOT M J, BUNDOCK P, HOOYKAAS P J, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16(9): 839-842.
- [9] CHEN X, STONE M, SCHLAGNHAUFER C, et al. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4510-4513.
- [10] MEYER V, MUELLER D, STROWIG T, et al. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*[J]. Current Genetics, 2003, 43(5): 371-377.
- [11] RHO H S, KANG S, LEE Y H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*[J]. Molecules & Cells, 2001, 12(3): 407-411.
- [12] CAMPOY S, PEREZ F, MARTÍN J F, et al. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Current Genetics, 2003, 43(6): 447-452.
- [13] MICHIELSE C, ARENTSHORST M, RAM A, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42(1): 9-19.
- [14] IDNURM A, HEITMAN J. Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom[J]. PLoS biology, 2005, 3(4): e95.
- [15] ROGERS C W, CHALLEN M P, GREEN J R, et al. Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 241(2): 207-214.
- [16] RAUYAREE P, OSPINA-GIRALDO M D, KANG S, et al. Mutations in VMK1, a mitogen-activated protein kinase gene, affect microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae*[J]. Current Genetics, 2005, 48(2): 109-116.
- [17] GAO F, ZHOU B J, LI G Y, et al. A glutamic acid-rich protein identified in *Verticillium dahliae* from an insertional mutagenesis affects microsclerotial formation and pathogenicity[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15319.
- [18] TZIMA A K, PAPLOMATAS E J, RAUYAREE P, et al. VdSNF1, the sucrose nonfermenting protein kinase gene of *Verticillium dahliae*, is required for virulence and expression of genes involved in cell-wall degradation[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2011, 24(1): 129-142.
- [19] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning, a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [20] LIU G Y, CHEN Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. Biotechniques, 2007, 43(5): 49-50.
- [21] 黎明, 于天飞. DNASTar 软件在动物病毒研究中的应用实例[J]. 高师理科学刊, 2010, 30(3): 61-63.
LI M, YU T F. The application of DNASTar soft in research of animal virus[J]. Journal of Science of Teachers' College and University, 2010, 30(3): 61-63.
- [22] 彭珊, 吕雪莲, 高峰, 等. 一种新的棉花黄、枯萎病快速接种方法的研究[J]. 棉花学报, 2008, 20(3): 174-178.
PENG S, LÜ X L, GAO F. Study on a new rapid inoculation method for verticillium wilt and fusarium wilt of cotton[J]. Journal of Cotton, 2008, 20(3): 174-178.
- [23] KLOSTERMAN S J, ATALLAH Z K, VALLAD G E, et al. Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species[J]. Annual Review of Phytopathology, 2009, 47(1): 39-62.
- [24] PEGG G F, BRADY B L. Verticillium wilts[M]. New York: CABI Publishing, 2002.

- [25] CORINNE J V, ROBERT D, MAGALI P, et al. IDC1, a pezizomycotina-specific gene that belongs to the PaMpk1 Map kinase transduction cascade of the filamentous fungus *Podospora anserina* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2007, 44 (12): 1219-1230.
- [26] MITCHELL C A, TUCKER A C, ESCALANTE-SEMERENA J C, et al. The structure of *S. lividans* acetoacetyl-CoA synthetase shows a novel interaction between the C-terminal extension and the N-terminal domain [J]. *Proteins Structure Function & Bioinformatics*, 2015, 83(3): 575-581.
- [27] TUCKER A C, ESCALANTE-SEMERENA J C. Acetoacetyl-CoA synthetase activity is controlled by a protein acetyltransferase with unique domain organization in *Streptomyces lividans* [J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 87(1): 152-167.
- [28] KATTA S S, CHEN J J, GARDNER J M, et al. Sec66-dependent regulation of yeast spindle-pole body duplication through Pom152 [J]. *Genetics*, 2015, 201(4): 1479-1495.
- [29] HETTY J, MEIJSEN I C, HAGEDOORN R S, et al. Characterization of the T-cell-mediated immune response against the *Aspergillus fumigatus* proteins Crf1 and Catalase 1 in healthy individuals [J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2013, 208(5): 847-856.
- [30] 黄翠莲. 核仁蛋白 Dnt1 在裂殖酵母 rDNA 沉默中功能的初步研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2009.
- HUANG C L. Potential role for nucleolar protein Dnt1 in rDNA silencing in fission yeast [D]. Xiamen: Xiamen University, 2009.
- [31] LUO X M, MAO H Q, WEI Y M et al. The fungal-specific transcription factor Vdpf influences conidia production, melanized microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(9): 1364-1381.
- [32] KADIOGLU O, EFFERTH T. Peptide aptamer identified by molecular docking targeting translationally controlled tumor protein in leukemia cells [J]. *Invest New Drugs*, 2016, 34(4): 515.
- [33] OH Y T, AHN C S, JEONG Y J, et al. *Aspergillus nidulans* translationally controlled tumor protein has a role in the balance between asexual and sexual differentiation and normal hyphal branching [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 343(1): 20-25.
- [34] WANG Z Q, LI G Z, GONG Q Q, et al. encoding a translationally controlled tumor protein, plays an important role in mercury tolerance in rice [J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15(1): 1-15.
- [35] 康真玉. 细胞质动力蛋白与牛痘疹病毒 1 型相互作用初步研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- KANG Z Y. The Preliminary Study of interactions between the bovine herpesvirus type 1 virion and cytoplasmic dynein [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.

Phenotypic Analysis and Functional Identification of T-DNA Insertional Mutants in *Verticillium dahliae*

CAI Jie, LUO Xiumei, CHEN Shanshan, XIE Chengjian, YANG Xingyong

(Laboratory of Plant Disease Resistance, Chongqing Key Laboratory of Molecular Biology of Plant Environmental Adaptation, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] *Verticillium* wilt is indispensable for revealing the pathogenicity mechanisms through functional analysis of pathogenicity related genes. [Methods] *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) method, 650 T-DNA randomly insertional mutants were constructed. The left-flanking sequence of the insertional sites of 17 mutant strains were cloned using hiTAIL-PCR and were identified using Blastn. [Findings] 2 strains are yellow mycelium type, and 6 strains are intermediate filament type, which were different from the phenotype of WT V991. Additionally, 7 mutants, 14 mutants and 4 mutants were significantly different from the WT on the growth rate, spore yield and crude toxin content individually ($p < 0.05$). Compared with the pathogenicity of the wild type strains Vd991, that of nine mutant strains were significantly reduced ($p < 0.05$). [Conclusions] The results provide theoretical fundament for the screening and identification of pathogenicity related genes.

Keywords: verticillium wilt; *Verticillium dahliae*; T-DNA insertional mutants; biological characteristics; genetic function

(责任编辑 方 兴)