

贾慧,郭丽婕,曹志艳,等. 玉米大斑病菌黑色素合成调控基因 *StMRI* 回复载体的构建[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):24-27.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.007

玉米大斑病菌黑色素合成调控基因 *StMRI* 回复载体的构建

贾慧,郭丽婕,曹志艳,郑云梅

(河北农业大学生命科学学院/河北省植物生理与分子病理学重点实验室,河北保定 071001)

摘要:为研究玉米大斑病菌黑色素合成调控基因 *StMRI* 的功能,采用 PCR 方法克隆得到 *StMRI* 基因 3 021 bp 的 OFR 序列,将其插入到含有色氨酸强启动子、*GFP* 和 *bar* 基因抗性的质粒 pBARKS1 - eGFP 上构建回复载体 pBARKS1 - MR - eGFP,通过测序、双酶切验证载体构建情况。结果显示,pBARKS1 - MR - eGFP 载体构建成功,可以进行基因回复转化试验。该结果为进一步确定黑色素合成调控途径,进而明确黑色素合成调控机制奠定基础。

关键词:玉米大斑病菌;黑色素;调控基因;*StMRI*

中图分类号: S435.131.4⁺9

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2015)08-0024-03

玉米大斑病在世界范围内广泛存在,是我国冷凉地区如东北、华北和西南玉米区重要叶部病害^[1-2],种植感病品种如遇到流行年份可减产 50% 以上。例如,2012 年受布拉万台风的影响,东北地区潮湿多雨,玉米大斑病大暴发,平均危害程度 3~5 级,严重地块达 9 级。引起该病害的病原菌属半知菌突脐蠕孢属,1876 年在意大利首次报道,其无性态为玉米大斑凸脐蠕孢菌 (*Exserohilum turcicum*),有性态为玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*)。有研究发现,玉米大斑病菌代谢产生的 DHN 黑色素是该病菌致病的重要毒力因子,沉积在真菌特化结构、附着在胞细胞壁和细胞膜之间,产生机械压力突破寄主表皮细胞,使植物染病^[3]。

DHN 黑色素合成途径至少有聚酮体合成酶、还原酶、脱水酶、氧化酶 4 类蛋白酶参与。起始于 1 个聚酮体合成酶 (polyketide synthase),催化醋酸盐合成 1,3,6,8-4THN,经还原酶 (1,3,6,8-tetra-HN reductase) 催化合成小柱孢酮 (scytalone),脱水酶 (scytalone dehydratase) 催化合成 1,3,8-THN,还原酶 (1,3,8-tetra-HN reductase) 催化合成柱孢醌 (vermelone),再经脱水酶催化合成 1,8-DHN,最后经氧化酶 (laccase) 氧化聚合成 1,8-DHN 黑色素。另外,该途径中还存在一种调控黑色素生物合成的转录因子 MR^[4]。研究发现,调控黑色素合成的转录因子能够调节黑色素合成途径中的多个关键酶基因的表达,进而影响黑色素的生成,改变病原菌致病力。水稻胡麻斑病菌 (*Bipolaris oryzae*) 中黑色素合成调控基因 *BMRI* 突变后,菌落颜色变白,过表达菌株的 *BMRI* 表达量高于野生型的 10 倍^[5]。葫芦刺盘孢 (*Colletotrichum lagenarium*) 和稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 中 *Cmr1p* 和

Pig1p 是黑色素合成转录因子,编码基因 *Cmr1* 和 *Pig1* 突变后病原菌的黑色素合成受到影响,回复突变后,病原菌生长表型与野生型相似,说明功能回复到正常水平^[4]。甘蓝链格孢 (*Alternaria brassicicola*) 黑色素合成调控基因 *Amr1* 突变后,病原菌菌落颜色变浅,接种白菜叶片发现致病力较野生型增强^[6]。同时,文献报道,丝状真菌中黑色素合成酶基因缺失或沉默,黑色素合成则会受到影响,病原菌的致病力也有不同程度的变化^[7]。玉米大斑病菌中聚酮体合成酶基因 (*StPKS*) RNAi 的几株转化子黑色素合成受到不同程度的干扰^[8];玉米大斑病菌中 HN 还原酶基因 (*3HNR*) 突变则形成浅褐色突变菌株^[9];玉米小斑病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) 脱水酶基因 (*scl1*) 缺失后形成橙红色菌落^[10];条件致病真菌新型隐球酵母菌 (*Cryptococcus neoformans*) 氧化酶基因 *LAC1* 缺失后,菌落颜色发生了变化,而同工酶基因 *LAC2* 的转录水平远远低于 *LAC1* 基因,该基因缺失后,病原菌黑色素合成速度延迟,合成量并未受到影响^[11]。目前,以抑制黑色素合成过程中从 1,3,6,8-四羟基萘到小柱孢酮、1,3,8-三羟基萘到柱孢醌的 2 步脱氢反应的 2 个还原酶为靶点开发的特异性抑制剂——三环唑 (tricyclazole) 作为新型杀菌剂防治稻瘟病菌,有良好效果^[12]。本研究室前期克隆到黑色素合成调控基因 *StMRI*,利用基因敲除技术获得了该基因的 2 株基因缺失突变体,初步分析了突变体的生长发育、黑色素合成及致病性等与野生型的差别,初步明确了该基因的功能,发现 *StMRI* 基因缺失后,病原菌生长速度没有明显变化,黑色素含量显著降低,致病力明显减弱。本试验在前期研究的基础上构建 *StMRI* 基因回复载体,从而对 *StMRI* 基因功能及黑色素合成调控机制进行深入研究,以阐明玉米大斑病菌的致病机制,也可以为研发新型杀菌剂、探索新的防治途径提供理论基础。

1 材料与方

1.1 试验材料

玉米大斑病菌菌株 01-23, pBARKS1 - eGFP 载体、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞、SDS 碱裂解溶液 (溶

收稿日期:2015-04-11

基金项目:河北省自然科学基金(编号:C2011204066);河北省教育厅项目(编号:Z2011109)。

作者简介:贾慧(1977—),女,实验师,研究方向为植物分子病理学。E-mail:hui_jiahui@126.com。

通信作者:曹志艳,副研究员,硕士生导师。E-mail:caoyan208@126.com。

液 I、II、III),由河北农业大学真菌毒素与植物分子病理学实验室保存或配制;UNIQ-10 柱式 Trizol RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、DEPC、DNase I (RNase free)、RNasin、dNTP Mixture、限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、 T_4 -DNA 连接酶,购自宝生物(大连)有限公司;引物的合成和测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2 总 RNA 的提取

参照 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒说明书,取经 PD 液体培养基 21 °C、黑暗培养 7 d 的玉米大斑病菌菌丝,滤纸吸干,取 0.1 g 用液氮研磨成粉末,转移至 1.5 mL 离心管中,加入 Trizol 试剂 1 mL,并用枪头反复吹打,室温放置 5~10 min,使核蛋白与核酸完全分离;加入 200 μ L 三氯甲烷:异戊醇(24:1)剧烈振荡 30 s,室温放置 3 min,12 000 r/min 4 °C 离心 10 min;吸取上层水相转移至干净离心管中,加入 1/2 体积无水乙醇,混匀;将吸附柱放入收集管中,用移液器将溶液和半透明纤维状悬浮物全部加至吸附柱中,静置 2 min,12 000 r/min 离心 3 min,倒掉收集管中废液;将吸附柱放入收集管中,加入 500 μ L RPE Solution,静置 2 min,10 000 r/min 离心 30 s,倒掉收集管中废液(检查 RPE Solution 是否已经按比例加入无水乙醇),此步骤重复 1 次;将吸附柱放回收集管中,10 000 r/min 离心 2 min,将残余的乙醇去除;将吸附柱加入干净的 1.5 mL 离心管中,在吸附膜中央加入 30 μ L DEPC-treated ddH₂O,静置 5 min,12 000 r/min 离心 2 min,提取得到 RNA 样品溶液,-80 °C 超低温冰箱中保存备用。配制 1.0% 琼脂糖凝胶,电泳检测得到的总 RNA 的纯度及完整性;紫外分光光度计检测其浓度和纯度。

1.3 反转录合成第一链 cDNA

反转录反应:1 μ g 模板 RNA,1 μ L Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (50 μ mol/L),RNase free ddH₂O 补充至 6 μ L,70 °C 保温 10 min 后迅速在冰上急冷 2 min 以上,离心数秒使模板 RNA/引物的变性溶液聚集于微管底部;在该微管中加入 5 \times M-MLV buffer 2 μ L,dNTP Mixture (10 mmol/L) 0.5 μ L,RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 0.25 μ L,RTase M-MLV (RNase H-,200 U/ μ L) 0.25~1 μ L,RNase free ddH₂O 补充至 10 μ L;42 °C 保温 1 h,70 °C 灭活反转录酶活性 15 min,插冰上冷却;反应合成第一链 cDNA,-20 °C 保存备用。

1.4 *StMRI* 基因 ORF 序列的获得

分析 *StMRI* 基因序列的酶切位点,根据载体 pBARKS1-eGFP 上的多克隆位点,设计带有酶切位点 *Not* I 和 *Sma* I 的特异引物 MGF/MGR,扩增 *StMRI* 基因的 ORF 序列。

MGF;5'-AAGCGGCCGCATGTTTCTGCACATACTGCG-3'
Not I

MGR;5'-CGCCCGGGCCGCGCAAGCTTTTG-3'

Sma I

扩增体系:2 μ L 模板 cDNA,MGF (10 μ mol/L) 1.0 μ L,MGR (10 μ mol/L) 1.0 μ L,2.5 μ L 10 \times *Taq* buffer (Mg²⁺ Plus),2 μ L dNTP Mixture (2.5 mmol/L),0.3 μ L *Taq* DNA 聚合酶 (5 U),ddH₂O 16.2 μ L。

扩增程序:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,61 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 4 min,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,紫外凝胶成像仪

(Bio-Rad) 观察结果显示,DNA 凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 扩增产物。

1.5 *StMRI* 基因回复载体的构建

将回收 PCR 扩增产物和 pBARKS1-eGFP 载体用 *Sma* I、*Not* I 双酶切,酶切体系为 pBARKS1-eGFP 质粒 DNA 2 μ L (PCR 回收产物 5 μ L),*Sma* I、*Not* I 各 1 μ L,缓冲液 2 μ L,ddH₂O 补充至 10 μ L,37 °C 酶切 3 h。酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收线性质粒片段和 PCR 产物。然后进行连接反应,反应体系为 PCR 扩增产物 5 μ L、pBARKS1-eGFP 线性质粒 1 μ L、 T_4 连接酶 (350 U/ μ L) 1 μ L、10 \times ligation buffer 1 μ L (终浓度为 1 \times),用 dd H₂O 补至 10 μ L,最适连接温度为 16 °C,时间为 1~3 h 或过夜;将连接产物转化感受态细胞大肠杆菌 DH5 α ,37 °C 培养过夜,随机挑取白色单菌落于 5 mL LB 液体培养基 (含 100 μ g/mL Amp⁺) 中,37 °C、220 r/min 下振荡培养 5~6 h;取 2 μ L 菌液作模板,利用 pBARKS1-eGFP 载体上的通用引物 T₃/T₇ 和特异引物 MGF/MGR 进行 PCR 检测;选取 PCR 检测阳性的单克隆测序;将测序正确的阳性克隆命名为 pBARKS1-MR-eGFP。

2 结果与分析

2.1 玉米大斑病菌总 RNA 的提取

利用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取 PD 培养 7 d 的玉米大斑病菌菌体的总 RNA,紫外分光光度计测定 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}} = 1.98$,浓度为 35.7 μ g/ μ L,表明所提取的总 RNA 质量较好、无蛋白质、DNA 及小分子的污染。琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示 28S、18S、5S 特征条带清晰(图 1),说明总 RNA 质量较好,无降解,可以用于 cDNA 第一链的合成。

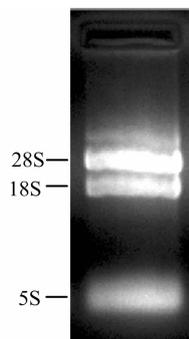


图1 总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳分析结果

2.2 *StMRI* 基因 ORF 序列的扩增

利用 *StMRI* 基因序列的酶切位点,结合载体质粒 pBARKS1-eGFP 上的多克隆位点,最终选用限制性内切酶 *Not* I 和 *Sma* I,设计 1 对带有酶切位点的特异引物,以反转录的 cDNA 为模板,扩增 *StMRI* 基因 ORF 序列,得到 3 021 bp 的条带,与预期大小相符(图 2)。

2.3 pBARKS1 和 pBARKS1-eGFP 载体的酶切验证

提取 pBARKS1 载体质粒,用 *Not* I 和 *Sma* I 进行双酶切,得到线性质粒,琼脂糖凝胶电泳检测结果显示有单一的 4 500 bp 条带(图 3-A);提取 pBARKS1-eGFP 载体质粒,用 *Eco* R I 和 *Sac* I 进行双酶切,得到线性载体 pBARKS1 和 GFP 片段,琼脂糖凝胶电泳检测显示有 4 500、720 bp 等 2 条条带(图 3-B)。说明 pBARKS1-eGFP 质粒载体正确。

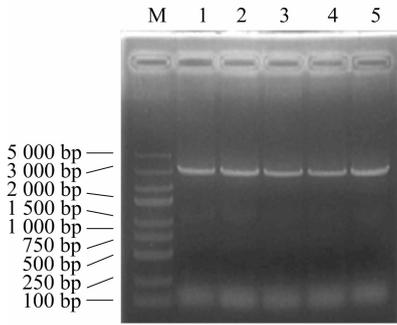
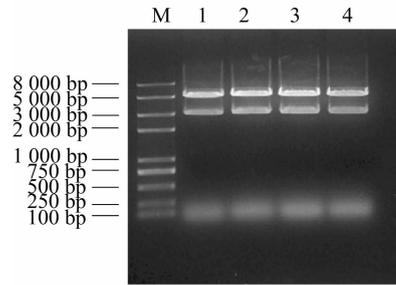
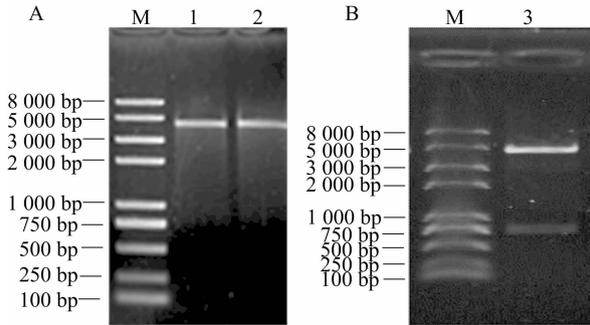
图2 *StMR1* 基因 ORF 片段的扩增M—DNA marker; 1~4—BARKS1-MR-eGFP 载体
图5 重组质粒 pBARKS1-MR-eGFP 的酶切检测A—*Not* I 和 *Sma* I 双酶切 pBARKS1 载体;
B—*Eco*RI 和 *Sac* I 双酶切 pBARKS1-eGFP 载体

图3 pBARKS1 和 pBARKS1-eGFP 载体的酶切验证结果

2.4 回复载体的构建

将 PCR 产物分别和 pBARKS1-eGFP 用 *Not* I 和 *Sma* I 进行双酶切,回收目的片段后将带有相同黏性末端的 PCR 产物和线性的 pBARKS1-eGFP 连接,转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,转化后选择白色单克隆进行菌液检测,引物用载体通用引物 T₃/T₇ 和特异引物 MGF/MGR 进行 PCR 扩增验证,挑取阳性克隆进行测序,结果正确,得到 pBARKS1-MR-eGFP 重组载体(图4)。载体 pBARKS1-MR-eGFP 全长约 8 241 bp,*Not* I 与 *Sma* I 双酶切得到大小为 5 220、3 021 bp 的条带,结果均与预期大小相符(图5),玉米大斑病菌黑色素调控基因 *StMR1* 的基因回复表达载体构建成功。

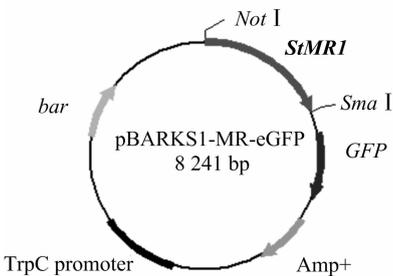


图4 pBARKS1-MR-eGFP 载体构建图示

3 结论与讨论

目前,随着 DNA 测序技术的飞速进步,很多丝状真菌已经完成了基因组测序工作,对其研究已步入后基因组时代,分析和确定基因的功能及关联性正成为分子生物学及遗传学研究的热点^[13]。研究真菌基因功能的方法有很多种,如基因敲

除/置换 (gene knockout)、RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)、基因标记 (gene tagging)、基因超表达 (over expression)、体外转座子标记 (*in vitro* transposon tagging)、异源表达 (heterologous expression) 和酵母双杂交 (yeast two-hybrid system) 等。基因敲除技术是一种遗传工程修饰技术,某个基因一旦被确定有研究价值,往往最为直接的方式之一就是将其从基因组中敲除或置换,而后测定相关指标,明确其功能^[14]。该技术是通过同源重组的方法将外源基因定点整合入靶细胞基因组上某一确定的位置,经过外源 DNA 序列与靶细胞内染色体上同源 DNA 序列间的重组或置换,达到定点修饰改造染色体上某一基因的目的,从而改变细胞的遗传特性^[15]。回复突变 (reverse mutation) 指基因缺失突变体经过第 2 次突变又完全或部分恢复为原来的基因型和表现型,基因超表达指目的基因的全长序列与高活性组成型启动子或组织特异性启动子融合,通过转化,获得该基因编码产物大量积累,这 2 种技术的应用更丰富了基因功能研究的证据。研究方案中通常会设计创制基因敲除突变体、回复突变体和超表达突变体。笔者所在实验室前期克隆到玉米大斑病菌黑色素合成调控基因 *StMR1* 序列,并创制了基因敲除突变体(结果待发表),在此基础上,本试验构建了含有色氨酸强启动子、绿色荧光蛋白编码基因 *GFP* 和草胺磷抗性基因 *bar* 的回复载体 pBARKS1-MR-eGFP,可将重组的载体通过 PEG 介导转化玉米大斑病菌黑色素合成基因 *StMR1* 缺失突变体的原生质体,或玉米大斑病菌野生型菌株的原生质体,利用草胺磷抗性培养基继代培养获得草胺磷抗性转化子,通过分析 *bar* 基因、*GFP* 基因及 2 个同源臂 DNA 序列设计特异引物,对转化子进行 PCR 初步筛选,将筛选的转化子用 *bar* 基因和 *GFP* 基因为探针进行 Southern blot 验证是否为该基因的回复突变体或超表达突变体,并对该突变菌株进行各项研究分析,如表型分析,附着胞形成能力及穿透能力、毒素产生能力、分生孢子萌发及突变菌株的侵染能力等,从而对 *StMR1* 基因功能进行深入研究。另外,该载体含有绿色荧光蛋白基因 *GFP*,在生物体内可以表达绿色荧光蛋白,通过荧光显微镜(荧光共聚焦显微镜)定位目的蛋白的位置。

参考文献:

- [1] 王会伟,李洪杰,朱振东,等. H2 背景下玉米对大斑病菌 1 号小种抗性基因的表达差异研究[J]. 植物病理学报,2010,2(2):135-143.
- [2] 郭丽媛,贾慧,曹志艳,等. 玉米大斑病菌有性杂交后代的交配型与寄生适合度分化[J]. 中国农业科学,2013,46(19):4058-4065.

马玉花,冶贵生,冯志鹏. 柴达木盆地梭梭耐盐相关基因 *PrxQ* 的克隆及其蛋白结构预测 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 27-30.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.008

柴达木盆地梭梭耐盐相关基因 *PrxQ* 的克隆及其蛋白结构预测

马玉花, 冶贵生, 冯志鹏

(青海大学农牧学院, 青海西宁 810016)

摘要:对柴达木盆地梭梭的 *PrxQ* 基因进行扩增,并利用生物软件对 *PrxQ* 基因序列进行分析,对蛋白结构进行预测。结果表明:柴达木盆地梭梭 *PrxQ* 基因长度为 657 bp,编码 218 个氨基酸;*PrxQ* 蛋白亲水性、二级结构、亚细胞定位、信号肽、跨膜螺旋区、三级结构预测结果显示,柴达木盆地梭梭 *PrxQ* 蛋白亚细胞定位于叶绿体,蛋白二级结构主要为无规则卷曲;*PrxQ* 具有 2 个 *N*-糖基化位点、7 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,此外 *PrxQ* 蛋白的亲水性较强,无跨膜螺旋区。柴达木盆地梭梭 *PrxQ* 蛋白三维结构预测结果显示,*PrxQ* 蛋白三维结构由 α 螺旋、 β 折叠、无规则卷曲互相盘绕而成。

关键词:梭梭;*PrxQ* 基因;序列分析;蛋白结构

中图分类号: S718.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0027-04

梭梭 (*Haloxylon ammodendron*) 为藜科 (Chenopodiaceae) 梭梭属 (*Haloxylon* Bunge) 多年生小乔木,别称琐琐、梭梭柴,属强旱生植物^[1],主要分布在我国新疆的准噶尔盆地、塔里木盆地,内蒙古阿拉善盟、巴彦淖尔盟,甘肃的河西走廊西端,青海柴达木地区荒漠地区,生长于海拔 2 700 ~ 3 000 m 的半

荒漠、荒漠地区的沙地,为国家濒危三级保护植物^[2]。

柴达木盆地是我国土地盐碱化的主要发生地区之一,由于该地区气候高寒干燥,蒸发量大而降水量小,加上风蚀、沙化严重,使盆地存在着沙漠化、盐渍化的双重危害,严重制约着该区社会经济的可持续发展。作为柴达木盆地旱生、盐生荒漠植被组成的主体,梭梭是当地流动沙地治理的先锋树种,它不仅具有显著的生态价值,而且具有很重要的药用价值,因而对其研究和开发利用具有重要的生态、经济、社会价值。

盐胁迫导致的渗透胁迫和离子毒害使植物产生大量的活性氧 (ROS),ROS 浓度的提高会积累丙二醛 (MDA) 等有害过氧化物,造成膜脂过氧化,使 ROS 产生与清除之间的动态平

收稿日期:2015-01-29

基金项目:青海省自然科学基金(编号:2012-Z-938Q);“123”高层次人才培养工程(编号:)

通信作者:马玉花(1978—),女,青海乐都人,博士,副教授,主要从事森林培育理论与技术、植物资源开发利用方面的研究。E-mail: sphere8@163.com。

[3] 范永山,谷守芹,董金皋,等. MAPK 途径对玉米大斑病菌 HT-毒素产生和生物学活性的调控作用[J]. 中国农业科学, 2008, 1(9): 86-92.

[4] Tsuji G, Kenmochi Y, Takano Y, et al. Novel fungal transcriptional activators, *Cmr1p* of *Colletotrichum lagenarium* and *Pig1p* of *Magnaporthe grisea*, contain *Cys2His2* zinc finger and Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA-binding motifs and regulate transcription of melanin biosynthesis genes in a developmentally specific manner[J]. Molecular Microbiology, 2000, 38(5): 940-954.

[5] Kihara J, Moriaki A, Tanaka N, et al. Characterization of the *BMRI* gene encoding a transcription factor for melanin biosynthesis genes in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 281(2): 221-227.

[6] Cho Y, Srivastava A, Ohm R A, et al. Transcription factor *Amr1* induces melanin biosynthesis and suppresses virulence in *Alternaria brassicicola*[J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(10): e1002974.

[7] 曹志艳,于清,范永山,等. 玉米大斑病菌黑色素缺失突变体的获得及其生物学特性[J]. 植物保护学报, 2007, 34(3): 268-272.

[8] 张鑫,曹志艳,刘士伟,等. 玉米大斑病菌聚酮体合成酶基因

SUPKS 功能分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(8): 1603-1609.

[9] Xue C S, Wu D L, Condon B J, et al. Efficient gene knockout in the maize pathogen *Setosphaeria turcica* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. Phytopathology, 2013, 103(6): 641-647.

[10] Saitoh Y, Izumitsu K, Morita A, et al. Cloning of *Sall*, a scytalone dehydratase gene involved in melanin biosynthesis in *Cochliobolus heterostrophus*[J]. Mycoscience, 2012, 53(4): 330-334.

[11] Pukkila-Worley R, Gerrald Q D, Kraus P R, et al. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade[J]. Eukaryotic Cell, 2005, 4(1): 190-201.

[12] 郭欣欣,贾慧,曹志艳,等. 特异性抑制剂三环唑对玉米大斑病菌致病力的影响[J]. 植物保护学报, 2012, 39(4): 364-368.

[13] 许杨,涂追. 丝状真菌基因敲除技术研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(1): 120-126.

[14] Weld R J, Plummer K M, Carpenter M A, et al. Approaches to functional genomics in filamentous fungi[J]. Cell Research, 2006, 16(1): 31-44.

[15] Capecchi M R. Altering the genome by homologous recombination[J]. Science, 1989, 244: 1288-1292.