

李俊香,古勤生.根癌农杆菌介导的真菌遗传转化研究进展[J].江苏农业科学,2020,48(3):43-49.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.03.008

根癌农杆菌介导的真菌遗传转化研究进展

李俊香^{1,2},古勤生¹

(1. 中国农业科学院郑州果树研究所,河南郑州 450009; 2. 华中农业大学植物科技学院,湖北武汉 430070)

摘要:根癌农杆菌介导的遗传转化是近 20 年来真菌研究的主要技术之一。农杆菌介导转化(ATMT)技术已广泛应用于随机突变试验中,以确定哪些基因是真菌与昆虫、植物、哺乳动物甚至其他真菌的致病相关基因。该技术广泛地应用于正向和反向遗传学,使得许多真菌基因功能得以阐明。尽管 ATMT 技术影响深远,但该技术作为一种转化工具在真菌中的应用并不均衡。本文综述了 ATMT 技术在发掘真菌功能基因方面的最新进展,以及它的优点和局限性。

关键词:根癌农杆菌;丝状真菌;遗传转化;ATMT 技术

中图分类号: Q949.32;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)03-0043-06

1998 年, Dunn - Coleman 等在《Nature Biotechnology》杂志上发表了一个评论,介绍了真菌上应用的一个新的转化技术,即利用根癌农杆菌将外源的 DNA 转入到丝状真菌中^[1]。当外源 DNA 转入真菌进而整合到真菌基因组的过程中有可能破坏一个关键的基因而引起性状的改变,据此可以了解有关真菌基因或多或少的信息。将根癌农杆菌应用于真菌的遗传转化,这一非凡创举早在 1995 年于模式生物酿酒酵母中首次被证实^[2],1996 年利用农杆菌转化了酵母^[3],1998 年将这一植物病原细菌成功应用于子囊菌和担子菌等 7 种丝状真菌的转化中^[4]。从 1995 年第一次报道根癌农杆菌介导真菌遗传转化到 2005 年,10 年间,该技术已成功应用于 50 余种真菌^[5]。此后 10 年,根癌农杆菌介导的遗传转化在真菌中的应用不断扩大,在许多真菌中甚至作为一种标准的试验技术进行基因操作。有些真菌,农杆菌介导转化(ATMT)技术是最容易甚至是唯一的一种引入外源 DNA 的试验技术。在其他真菌种类中,ATMT 成为一种强大的正向遗传学技术,用于构建携带 T-DNA 随机插入标签的突变体库并用于基因分析,抑或用于反向遗传学构建特定

靶基因替代的突变体,还可操控基因的表达以取得生物工程方面的效益。了解这项技术是如何应用的能够指导或预测未来技术在真菌中的应用,从而推进真菌方面的研究。

1 根癌农杆菌及其介导的真菌遗传转化

根癌农杆菌是一种植物病原菌,属于 α -变形菌,是自然界中一种天然的能创造转基因生物的介体。在这个过程中,根癌农杆菌将质粒的一个 DNA 片段插入到宿主植物细胞核基因组中,自然界里,这段细菌的 DNA 能够编码蛋白质用于改变植物的生长而利于自己的繁殖^[6]。在大多情况下,这会导致植物形成非增生性的瘿或瘤,被改变的受体基因组通常不会遗传给后代植株。然而,甘薯基因组分析表明,在很稀有的情况下,这些转化事件能够更永久地融合进受体植物基因组并遗传下去^[7]。农杆菌属细菌属于根瘤菌科,更接近于能与植物形成共生关系固定空气中氮素的根瘤菌属细菌。根癌农杆菌又被命名为放射型根瘤菌^[8],但真菌转化领域使用该物种作为转化介体时依旧使用根癌农杆菌这个名字。

在基因组测序工程发展以前,唯一已知的基因水平转移的例子,便是根癌农杆菌介导的基因从细菌转化整合到真核生物基因组中^[9]。根癌农杆菌天然地存在于自然环境中,这些细菌周围存在很多寄主,其中包括很可能恰好出现在植物伤口附近的真菌,受伤的植物能够诱导 T-DNA 从细菌到真菌的转移。Knight 等先在植物材料上共培养了植物病原真菌黄萎病菌和含有质粒的能潜在转化真菌

收稿日期:2019-01-08

基金项目:中国农业科学院科技创新工程项目(编号:CAAS-ASTIP-2019-ZFRI);国家西甜瓜产业技术体系项目(编号:CARS-26-13)。

作者简介:李俊香(1988—),女,河南郑州人,博士研究生,主要从事西甜瓜病害研究。E-mail:lijunxiang@163.com。

通信作者:古勤生,博士,研究员,主要从事西甜瓜病害防控研究。E-mail:guqinsheng@caas.cn。

的根癌农杆菌,然后在植物细胞中观察被转化的真菌,研究证明,这样的基因转化事件在自然环境中发生是完全可能的^[10]。当然,自然界中,这样将有益的 DNA 片段转化到真菌里的事件发生的概率是很小的,所以这样的转化事件很可能不具备选择优势,但有趣的是可以在进化的时间尺度上计算这种事件发生的频率。实际上,除了植物^[7],基因组测序发现,一些真菌基因组,如米曲霉菌基因组序列信息上发现了根癌农杆菌类似 DNA 序列^[11]。

植物分子生物学家将野生型根癌农杆菌改造成自己喜好的菌株。细菌菌株和遗传物质被修改,一方面阻止寄主植物根瘤的形成,另一方面将质粒上可以被转化到植物基因组上 T-DNA 的左右边界各添加 25 bp 的重复序列。从细菌遗传学角度,而不是能更精确描述 T-DNA 从细菌到真核寄主基因组转移的这种转化整合方法的角度看,这种基因整合机制可以在不同的物种间发生。根癌农杆菌寄主的多样性,能够使其应用到模式物种拟南芥以外的许多不同的真核物种当中,如真菌就是最好的例子^[9]。

笨拙的载体系统是根癌农杆菌介导的真菌遗传转化技术发展中最初的限制因素之一。一些根癌农杆菌载体非常难操作,因为这些载体是针对介导植物遗传转化开发的,其上携带传统克隆技术需要的有限的限制性酶切位点,这些限制性酶切位点便于预先设置植物转化上特殊需要的调节因子。幸运的是一些适用于植物遗传转化的载体中也包含一些小的载体,这些载体便于操作,因为它们含有未曾修改的 T-DNA 区域。一些改进的载体构建方法,如酿酒酵母中的酵母重组^[12-14],Gateway 系统^[15]和 Golden Gate 组装技术^[16],使载体构建和改造变得既简单又高通量。

根癌农杆菌介导的真菌遗传转化的另外一个限制因素是早期使用的那些载体能够插入的 DNA 长度有限,这对于大基因片段的互补是一个很大的技术限制。这个问题的解决办法之一是使用双元细菌人工染色体(BIBAC)技术系统,这个技术系统能够将任何一个含有真菌 DNA 大片段序列的人造细菌染色体修改成含有左右边界序列的大片段,从而实现真菌的直接转化。例如,使用这种方法成功地将 75 kb 的大 DNA 片段转化整合到黄瓜尖孢镰刀菌基因组中^[17]。一个相似的系统,即将人造细菌染色体转变成适用于玉蜀黍黑粉菌遗传转化的载体系统也被开发^[18]。

2 ATMT 相对于其他转化技术的优点

早在 ATMT 技术应用于真菌之前,真菌中使用其他转化方法,例如聚乙二醇或阳离子聚乙二醇介导的原生质体转化^[19-20]。然而,ATMT 技术相对于这些转化技术改进了许多,这也解释了在许多真菌中为什么选择 ATMT 作为转化工具。

首先,ATMT 技术不需要去除真菌细胞壁制备原生质体。然而,在一些真菌种类中,当其他转化方法难以实现或者不稳定时,原生质体转化依然是一个备选方案。不同的真菌有不同的细胞壁,并且在真菌的不同生长和发展阶段细胞壁也不同。这也解释了为什么在不同的真菌种类中,原生质体转化容易成功,但是这对于解决寻找合适细胞壁降解酶困难方面并没有什么帮助。相反,虽然根癌农杆菌对细胞类型有偏好性,但是,农杆菌可以转化的细胞种类很多,包括哺乳动物细胞^[21]、卵菌细胞^[22],以及许多真菌不同组织和类型的细胞。

ATMT 技术优于其他转化方法的第二个突出特点是,T-DNA 可以随机地插入到基因组中。因此,ATMT 技术的主要影响源自其为随机突变为正向遗传筛选提供资源。除了 ATMT 技术,REMI 技术也引起插入突变。但是 REMI 技术,在 DNA 转入原生质体细胞这个阶段需要限制性内切酶。另外,REMI 技术中存在许多问题,例如,突变与插入的 DNA 片段没有关系,而是因为限制性内切酶引起了 DNA 损伤。其他的插入突变技术包括转座子插入,但是这个方法往往需要根据不同的物种设计特殊的结构。在真菌随机插入突变转化方法上,ATMT 技术在很大程度上取代了 REMI 技术^[5]。因为在 ATMT 技术中,T-DNA 通常以单拷贝插入的形式整合到基因组中,所以,任何一个表型改变的突变体都很可能是由于插入引起的。通过筛选 T-DNA 插入突变体库,获得表型突变体,然后采用不同的方法通常是 PCR 技术获得 T-DNA 插入位点左右侧翼序列,来辨别受影响的基因。T-DNA 插入引起的突变,基因功能鉴定程序通常是:如果突变没有影响性周期,则连锁分析 T-DNA 突变体和对应变配型菌株的后代;根据研究机体选择合适的转化技术对靶标基因进行等位替代;用一个野生型基因进行互补试验。

ATMT 技术还可以采用反向遗传学的方法删除或破坏目的基因。这不同于随机插入突变,因为转

化载体上添加了 DNA 序列,这些序列含有受体基因组的特异位点,可以调节外源同源互补序列。因此,ATMT 技术可以在所需要的基因组区域尤其是在一个假定的开放阅读框处进行基因替换。ATMT 常常发生在非同源末端连接的 DNA 修复过程^[23]。这个过程产生的突变增加了基因替换转化子的比例。在过去的 10 年里,迅速增加的公共的可以利用的真菌基因组序列^[24],使得通过分析目标基因的删除来鉴定单个或基因家族相对容易。同一时期,出现了许多新的分子研究技术,其中包括诱导型启动子系统^[25]、可回收标记^[23],以及最新的 CRISPR - Cas 基因编辑^[26]。这些技术使得基因组功能分析达到高通量水平,使产业得以驯化,疾病发生关键过程以及许多真菌假定药物靶点的分析进入系统水平^[27]。因此,使用 ATMT 技术对真菌基因组进行针对性的操作是一个非常关键的技术,这将利于实现更多近期的突破。

最后,这个容易转化的方法,对基因功能的发掘实现了公平竞争,而不是由模式生物主导的分子生物学试验。对于非传统物种,一旦基因组序列可用,这种技术将变得非常实用。

3 ATMT 技术在真菌中的研究趋势

2005 年,Michielse 等在发表的一篇综述里描述了 ATMT 技术的转化特点^[5],然而,接下来的 10 年,一些研究趋势还在继续,更多焦点还是共培养条件对转化效率的影响,例如,细菌和真菌细胞浓度,共培养时间和温度以及受伤植物根释放的可以促进农杆菌转化的代谢产物乙酰丁香酮的浓度。专注于转化效率主要是为了与原生质体转化和其他转化方法作比较,因此努力优化转化条件以求获得最高的转化效率。然而,这并不重要,因为 ATMT 转化过程简单,如果需要更多的转化株,可以增加转化次数。相反地,ATMT 方法是一个理想的转化方法,因为采用该技术做转化能够快速获得一个单拷贝插入突变体库,并且感兴趣的突变体表型与基因突变相关,但是很少有研究表明,获得的转化子数量是否与单个转化子的 T-DNA 插入次数相关。目前更多的刊物趋向于报道在某个物种中首次成功使用 ATMT 转化技术,而很少有出版物报道如何合理地实施该技术以获得基因突变或者用于其他目的。考虑到 ATMT 技术成功转化的真菌只是种类繁多的真菌中的一小部分,所以仍旧有很多的未开发的资

源等待发掘。

4 ATMT 技术存在的问题和局限

前面突出强调了 ATMT 转化技术的使用给真菌领域带来的新的大的进步。然而,这个转化技术也不尽完美,研究者在使用该技术设计正向遗传学试验,替换靶标基因或分析从突变菌株获得的解释数据时应该考虑到这个技术的局限性。

考虑到产生成千上万个突变体是功能基因组研究的先决条件,所以要从几个方面对 ATMT 转化技术进行改进以克服重大试验的局限性,并确保这一技术非常高通量。然而在一些情况下,技术挑战是不可避免的。例如,虽然 96 孔板的应用促使醋酸锂或聚乙二醇介导的原生质体转化变得高通量化^[28],但是,采用 ATMT 技术进行相似地转化试验时,却不能使用 96 孔板模式。其中的技术挑战可能是微型化培养的根癌农杆菌不能使其在转化之前达到最佳的生长阶段。然而,在减少用于 ATMT 转化技术试验的根癌农杆菌密集型克隆负担方面已经取得了许多进步,这多亏于根癌农杆菌兼容质粒的出现。与醋酸锂或聚乙二醇介导的原生质体转化相比,这样的克隆更具挑战性,因为,在那里线型 DNA 片段可以通过简单的 PCR 阶段进行组装^[29]。研究者已经获得了与 Invitrogen 公司的 Gateway[®] 克隆技术兼容的根癌农杆菌质粒,例如,能超高通量产生一代 *Zymoseptoria tritici* 的过度表达菌株^[30]。又如,通过酿酒酵母中的酵母重组技术或 Golden Gate 组装技术构建根癌农杆菌兼容载体,使得高通量载体构建获得了相应提高^[12-14]。这些研究强调了一些重要技术挑战是如何被攻破的,另外,最近研究证明 ATMT 技术能够用于真菌高通量功能基因组分析^[30]。更确切地说,在真菌功能基因组大数据时代,如果同时考虑 ATMT 转化技术的优缺点,那么该技术依旧是一个非常有用的技术并将继续在真菌研究中扮演重要角色。针对存在的问题和局限,笔者有以下 4 点建议:

首先,一个理想的插入突变方法应该有能力击中每一个基因,但是 T-DNA 对真菌基因组插入存在非随机插入模式。例如,新型隐球菌黑色素生物合成 *LAC1* 基因插入突变体分析研究表明,在 1 kb 启动子区域有 5 个 T-DNA 插入,而 2.8 kb 的编码区没有 T-DNA 插入,所以 T-DNA 对这个单基因的插入是非随机的^[31-33]。又如,对数以万计的植物

致病性子囊菌 T-DNA 插入突变体分析表明, T-DNA 插入也存在偏好性, 不是随机的。这也许是想使用 ATMT 转化技术构建一个拥有每个基因都有 T-DNA 插入的突变体库的最大限制因素。尽管如此, T-DNA 倾向于插入到基因外部的插入模式最近已经转变成了一个鉴定必需基因的有利条件^[14]。如, 在紧邻 T-DNA 的右边界克隆上 *GAL7* 基因的调节序列, 并通过 ATMT 技术转入担子菌类新生隐球菌。转化和筛选都在含有半乳糖的介体中进行以确保插入位点附近的任何基因都能表达, 然后在含有能抑制 *GAL7* 基因表达的葡萄糖的介体中对转化子进行生长测试。在葡萄糖存在的情况下, 大约 1% 的转化子不能生长。分析 T-DNA 在新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 基因组中的插入位点, 表明这些位点位于子囊菌必需功能基因中。

其次, 理想情况下, T-DNA 的插入应包括完整的左右边界, 随后获得的突变体若表现出有趣的性状, 通过左右边界序列就可以快速鉴定出插入点附近的基因。鉴定这些被删除或破坏的基因可以通过交错式热不对称 PCR (TAIL-PCR), 反向 PCR 或其他的方法实现。然而, 这种基因鉴定程序可能会遇到瓶颈, 或者最终得到几种可能性结论。T-DNA 的不同插入方式可能为后续基因鉴定带来巨大挑战, 例如, 断裂式插入, 携带超越左右边界的额外的质粒 DNA 片段插入, 或者多拷贝串联插入, 抑或多拷贝分散插入。插入也可能伴随着基因删除和基因组染色体重排。若 T-DNA 倾向于插入到基因间隔区, 那么须要解决的问题是确定 2 个基因中的哪一个受插入的影响, 有时对 2 个基因都进行 qPCR 试验可以鉴定出被影响的基因。大多情况下假设 T-DNA 的插入减弱了相邻基因的表达。然而, 有些情况下, 如在 *Leptosphaeria maculans* 菌中 T-DNA 的插入会加强相邻基因的表达^[34]。

再者, 对于有些物种, ATMT 技术并不能比其他转化方法提供更多有价值的信息。对很多真菌来说, ATMT 技术并不能使我们更了解基因功能。这包括在真菌上首次应用该转化技术的酿酒酵母^[2]。这也是可以理解的, 因为其他的转化技术可以应用到酿酒酵母上, 可以使用化学诱变然后通过互补克隆基因, 可以构建和使用含有删除所有基因的整套的基因缺失库, 还可以利用基因组水平的资源。有这么多的技术可以分离突变体, 鉴定被影响的基因, 或表型筛选基因缺失库, 所以使用 ATMT 技术作

为另外一种转化方法几乎没有带来什么额外的益处。正如上面提到的, 类似的情况也存在于丝状真菌模式物种粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*), 该真菌虽然是首次使用根癌农杆菌介导转化的丝状真菌物种之一^[4], 但是此后再没使用该技术进行转化。第 3 个例子是关于粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*), 该菌是揭示细胞周期调控机制的模式物种, 而细胞周期调控机制曾是 2001 年诺贝尔生理学或医学奖的主题, 事实上, 这个菌及所在的外囊菌亚门的所有物种似乎都没有使用过 ATMT 技术进行转化。

最后, ATMT 转化技术通常情况下是质粒将 T-DNA 插入到基因组, 然而在一些真菌中, 例如转化玉米黑粉菌 (*Ustilago maydis*) 或曲霉菌属 (*Aspergillus* spp.) 使用含 AMA1 序列的质粒, 那么质粒将会进行自主复制^[35-36]。这些质粒可以容易地通过互补克隆被营救出大肠杆菌, 也可以通过反向选择被蓄意丢失。

5 展望

ATMT 转化技术是一种可以应用于植物和真菌分子生物学的工具, 但是我们对转化寄主方面的了解甚少。例如, 研究表明一组含 129 个拟南芥突变体库中的所有突变体对转化是有抵抗作用的^[37]。然而, 就分子工具和全基因组范围内可供研究的资源而言, 真菌超过了其他所有的真核生物, 因此可以作为理想的寄主用于研究真核细胞与细菌相互作用中寄主方面的角色。最近研究进展已经描述了 T-DNA 转移和插入过程^[38]。选择真菌作为寄主能够洞察提高转化效率的方法以及 T-DNA 的插入机制。酿酒酵母突变体曾被用于鉴定那些影响转化效率的因素^[39-44], 有一个发现是嘌呤浓度和生物合成也与植物上的转化效率有关^[45]。因此, 研究其他物种基因缺失库, 例如, *S. pombe* 或正在进行的 *N. crassa* 或 *C. neoformans* 研究项目, 都是为了寻找抗转化菌株。在多个物种中探索转化需要的真核基因是因为不同的真菌存在明显的差别, 如在 *C. neoformans* 中采用 ATMT 技术进行转化是不可能的, 而在其他担子菌中则可以, 又如酿酒酵母中嘌呤对转化效率的影响同时依赖于嘌呤合成基因以及酵母菌株^[45]。如果这些信息可以借鉴到植物上用于解释为什么有的植物种类采用这种方法很难转化, 那么这个研究方向将可能产生广泛影响。与转化相关的另一因素是根癌农杆菌本身, 当前研究

表明不同根癌农杆菌菌株转化效率不同。然而,很少有人能在 T-DNA 插入偏好性以及基因靶向效应方面对菌株进行一一研究。

目前,鉴定 T-DNA 插入的基因依旧是个限速步骤。在鉴定插入基因方面,基因组测序比 PCR 或其他方法成本更高。实际上,下一代测序已经被应用于鉴定突变的基因。对 *L. maculans* 而言,识别插入基因很困难,对 4 个菌株分别进行测序以鉴别 T-DNA 插入位点^[46]。另一种方法被应用于 *C. neoformans* 突变体插入基因的鉴定,即对突变体 DNA 池同时测序,然后单个菌株中被影响的基因采用特异 PCR 进行鉴定^[47-48]。将来结合标签、条形码、非对称限制性内切酶及可利用的下一代测序能力,对插入基因的鉴定将变得更加容易。

植物中有许多报道称共转化可同时引入多种 T-DNA 的插入^[49],然而在真菌中这个转化方法并不常见^[50]。这种方法允许转化各自不同的 T-DNA 片段,与曾在真菌中应用的非常成功的双向的或 split-marker 的能增强靶标基因敲除的方法相似^[29]。将来对其进一步改进可能会加强真菌中靶标基因敲除的能力^[51-52]。

生物研究领域新兴的一个激动人心的研究技术是 CRISPR/Cas 基因编辑系统,正如 ATMT 技术在过去 20 年中的角色一样,这种技术将革命性地改变真菌生物学研究。如同应用于酿酒酵母的 ATMT 技术,行之有效的真菌 CRISPR/Cas 技术将很可能革命性地降低这些物种带来的挑战,特别是低拷贝物种中的基因敲除。值得提出的是,ATMT 技术将依旧是许多真菌用于转化 CRISPR/Cas 结构的辅助工具。真菌中还没有开发的 ATMT 技术的另一个应用是瞬时转化。植物中有一种常规的方法可以引入 CRISPR/Cas 结构,如病毒侵染性克隆^[53],但是目前对真菌病毒操作困难,也许将来可以在真菌中使用类似的方法。也可以开发瞬时转化系统用于其他目的,如 CRISPR/Cas,这就可以规避将 T-DNA 整合到基因组以及引起脱靶突变的可能。目前,已经通过使用不稳定的自主质粒将 CRISPR/Cas 系统成功地转入子囊菌和 *U. maydis* 的原生质体^[54-56]。很显然,存在一种可能,即未来可以继续开发利用 ATMT 技术,但可能须要修改那些促使 T-DNA 插入真菌基因组的原件。

参考文献:

[1] Dunn - Coleman N, Wang H. *Agrobacterium* T-DNA: a silver bullet

- for filamentous fungi? [J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16 (9): 817 - 818.
- [2] Bundock P, Den Dulk - Ras A, Beijersbergen A, et al. Trans - kingdom T - DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *EMBO Journal*, 1995, 14 (13): 3206 - 3214.
- [3] Piers K L, Heath J D, Liang X, et al. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of yeast [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93 (4): 1613 - 1618.
- [4] de Groot M J A, Bundock P, Hooykaas P J J, et al. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of filamentous fungi [J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16 (9): 839 - 842.
- [5] Michielse C B, Hooykaas P J J, van den Hondel C A, et al. *Agrobacterium* - mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi [J]. *Current Genetics*, 2005, 48 (1): 1 - 17.
- [6] Tzfira T, Citovsky V. *Agrobacterium* - mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17 (2): 147 - 154.
- [7] Kyndt T, Quispe D, Zhai H, et al. The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T - DNAs with expressed genes: an example of a naturally transgenic food crop [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112: 5844 - 5849.
- [8] Young J M, Kuykendall L D, Martínez - Romero E, et al. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. viitis* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51 (1): 89 - 103.
- [9] Lacroix B, Citovsky V. Transfer of DNA from bacteria to eukaryotes [J]. *MBio*, 2016, 7 (4): e00863 - 00816.
- [10] Knight C J, Bailey A M, Foster G D. Investigating *Agrobacterium* - mediated transformation of *Verticillium albo - atrum* on plant surfaces [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (10): e13684.
- [11] Machida M, Asai K, Sano M, et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae* [J]. *Nature*, 2005, 438 (7071): 1157 - 1161.
- [12] Lu J, Cao H, Zhang L, et al. Systematic analysis of Zn₂Cys₆ transcription factors required for development and pathogenicity by high - throughput gene knockout in the rice blast fungus [J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10 (10): e1004432.
- [13] Kilaru S, Steinberg G. Yeast recombination - based cloning as an efficient way of constructing vectors for *Zymoseptoria tritici* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 79: 76 - 83.
- [14] Laniri G, Boyce K J, Idnurm A. Isolation of conditional mutations in genes essential for viability of *Coryptococcus neoformans* [J]. *Current Genetics*, 2017, 63 (3): 519 - 530.
- [15] Sidhu Y S, Chaudhari Y K, Usher J, et al. A suite of Gateway[®] compatible ternary expression vectors for functional analysis in *Zymoseptoria tritici* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 79: 180 - 185.
- [16] Engler C, Youles M, Gruetzner R, et al. A Golden Gate modular cloning toolbox for plants [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3

- (11):839–843.
- [17] Takken F L W, van Wijk R, Michielse C B, et al. A one – step method to convert vectors into binary vectors suited for *Agrobacterium* – mediated transformation[J]. *Current Genetics*, 2004, 45(4): 242–248.
 - [18] Ali S, Bakkeren G. Introduction of large DNA inserts into the barley pathogenic fungus, *Ustilago hordei*, via recombined binary BAC vectors and *Agrobacterium* – mediated transformation[J]. *Current Genetics*, 2011, 57(1): 63–73.
 - [19] Ito H, Fukuda Y, Murata K, et al. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations[J]. *Journal of Bacteriology*, 1983, 153(1): 163–168.
 - [20] van den Berg M A, Maruthachalam K. Genetic transformation systems in fungi, Vol. I & II [M]. Switzerland: Springer, 2015.
 - [21] Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, et al. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(4): 1871–1876.
 - [22] Vijn I, Govers F. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2003, 4(6): 459–467.
 - [23] Khrunyk Y, Münch K, Schipper K, et al. The use of FLP – mediated recombination for the functional analysis of an effector gene family in the biotrophic smut fungus *Ustilago maydis* [J]. *New Phytologist*, 2010, 187(4): 957–968.
 - [24] Grigoriev I V, Nikitin R, Haridas S, et al. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D699–D704.
 - [25] Gamboa – Meléndez H, Judelson H S. Development of a bipartite ecdysone – responsive gene switch for the oomycete *Phytophthora infestans* and its use to manipulate transcription during axenic culture and plant infection[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2015, 16(1): 83–91.
 - [26] Arazoe T, Miyoshi K, Yamato T, et al. Tailor – made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(12): 2543–2549.
 - [27] Cairns T C, Studholme D J, Talbot N J, et al. New and improved techniques for the study of pathogenic fungi [J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(1): 35–50.
 - [28] Gietz R D, Schiestl R H. High – efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(1): 31–34.
 - [29] Catlett N L, Lee B N, Yoder O C, et al. Split – marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes [J]. *Fungal Genetics Reports*, 2003, 50(1): 9–11.
 - [30] Cairns T C, Sidhu Y S, Chaudhari Y K, et al. Construction and high – throughput phenotypic screening of *Zymoseptoria tritici* over – expression strains[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 79(SI): 110–117.
 - [31] Idnurm A, Reedy J L, Nussbaum J C, et al. *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis [J]. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3(2): 420–429.
 - [32] Walton F J, Idnurm A, Heitman J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans* [J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(5): 1381–1396.
 - [33] Idnurm A, Walton F J, Floyd A, et al. Identification of ENA1 as a virulence gene of the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* through signature – tagged insertional mutagenesis[J]. *Eukaryotic Cell*, 2009, 8(3): 315–326.
 - [34] Elliott C E, Howlett B J. Overexpression of a 3 – ketoacyl – CoA thiolase in *Leptosphaeria maculans* causes reduced pathogenicity on *Brassica napus* [J]. *Molecular Plant – microbe Interactions*, 2006, 19(6): 588–596.
 - [35] Aleksenko A, Clutterbuck A J. Autonomous plasmid replication in *Aspergillus nidulans*: AMA1 and MATE elements [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 1997, 21(3): 373–387.
 - [36] Kojic M, Holloman W K. Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis* [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2000, 46(4): 333–338.
 - [37] Zhu Y, Nam J, Humara J M, et al. Identification of *Arabidopsis* rat mutants [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 494–505.
 - [38] Bourras S, Rouxel T, Meyer M. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: how a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms [J]. *Phytopathology*, 2015, 105(10): 1288–1301.
 - [39] van Attikum H, Bundock P, Hooykaas P J J. Non – homologous end – joining proteins are required for *Agrobacterium* T – DNA integration [J]. *The EMBO Journal*, 2001, 20(22): 6550–6558.
 - [40] Van Attikum H, Hooykaas P J J. Genetic requirements for the targeted integration of *Agrobacterium* T – DNA in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(3): 826–832.
 - [41] Soltani J, van Heusden G P H, Hooykaas P J J. Deletion of host histone acetyltransferases and deacetylases strongly affects *Agrobacterium* – mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 298(2): 228–233.
 - [42] Rolloos M, Dohmen M H C, Hooykaas P J J, et al. Involvement of Rad52 in T – DNA circle formation during *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 91(6): 1240–1251.
 - [43] Luo Y, Chen Z, Zhu D, et al. Yeast actin – related protein ARP6 negatively regulates *Agrobacterium* – mediated transformation of yeast cell [J]. *Biomed Research International*, 2015(5): 1–11.
 - [44] Ohmine Y, Satoh Y, Kiyokawa K, et al. DNA repair genes *RAD52* and *SRS2*, a cell wall synthesis regulator gene *SMI1*, and the membrane sterol synthesis scaffold gene *ERG28* are important in efficient *Agrobacterium* – mediated yeast transformation with chromosomal T – DNA [J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 58.
 - [45] Roberts R L, Metz M, Monks D E, et al. Purine synthesis and increased *Agrobacterium tumefaciens* transformation of yeast and plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(11): 6634–6639.
 - [46] Chambers K, Lowe R G T, Howlett B J, et al. Next – generation genome sequencing can be used to rapidly characterise sequences flanking T – DNA insertions in random insertional mutants of

徐彦刚,羊杏平,李良俊. 瓜类作物抗蔓枯病研究进展[J]. 江苏农业科学,2020,48(3):49-55.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.03.009

瓜类作物抗蔓枯病研究进展

徐彦刚^{1,2}, 羊杏平¹, 李良俊²

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏南京 210014; 2. 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009)

摘要:蔓枯病是瓜类作物生产中最主要的病害之一,其发病率呈现逐年上升的蔓延趋势,对我国乃至世界瓜类产业的发展造成严重危害。该病害致病菌可附着与土壤、病残体或其他宿主进行越冬,待翌年适宜的条件刺激后进行初侵染与再侵染,从而致使该病害防控难度增加及连年发生。目前该病的主要防治手段有化学防治、生物防治及抗性育种,抗性育种最为有效和安全,而不同瓜类作物之间对蔓枯病的抗性表现多为主效基因或多基因控制的数量性状,且在蔓枯病菌侵染瓜类作物时寄主表现出相似或不同的抵御方式,其中主要包括自身固有的物理屏障和外界触发的 PTI、EPI 免疫。因此,本文通过对不同瓜类作物间抗性遗传表现及防御机制进行阐述,以期对瓜类作物抗性育种及病害防控提供指导。

关键词:瓜类作物;蔓枯病;致病机理;抗病育种

中图分类号: S436.42 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)03-0049-07

蔓枯病(gummy stem blight)是一种典型的世界性土传病害,可危害西瓜(*Citrullus lanatus*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、甜瓜(*Cucumis melon*)、苦瓜

(*Momordica charantia*)、冬瓜(*Benincasae hispida*)、节瓜(*Benincasa hispida*)等至少 12 个属 23 种葫芦科作物^[1]。自 1981 年在法国首次发现该病以来,其后一直呈现扩大蔓延的暴发趋势,而今已广泛分布于中美洲、南美洲、加勒比海、亚洲、非洲、欧洲及大洋洲等地区^[2],且病情指数在瓜类作物中呈现逐年上升的态势,造成我国乃至世界瓜类作物产业的严重损失。特别是近几年来,随着我国塑料大棚、日光温室等设施瓜类作物栽培的迅猛发展,人们长期所进行的多茬次栽培与利用,不仅造成农业生态条

收稿日期:2018-12-04

基金项目:国家西甜瓜产业技术体系(编号:CARS-26-NO.8);江苏省农业三新工程项目[编号: SXGC(2017)259]。

作者简介:徐彦刚(1992—),男,甘肃平凉人,硕士研究生,从事植物抗病育种与综合治理研究。E-mail:1340111782@qq.com。

通信作者:羊杏平,博士,研究员,从事西瓜、甜瓜育种与生物技术研究。E-mail:1394654153@qq.com。

Leptosphaeria maculans[J]. Fungal Biology Biotechnology, 2014, 1(1):10.

[47] Esher S K, Granek J A, Alspaugh J A. Rapid mapping of insertional mutations to probe cell wall regulation in *Cryptococcus neoformans* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 82: 9-21.

[48] Gyawali R, Zhao Y, Lin J, et al. Pheromone independent unisexual development in *Cryptococcus neoformans*[J]. PLoS Genetics, 2017, 13(5): e1006772.

[49] Daley M, Knauf V C, Summerfelt K R, et al. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17(6/7): 489-496.

[50] Padilla-Guerrero I E, Bidochka M J. *Agrobacterium*-mediated co-transformation of multiple genes in *Metarhizium robertsii*[J]. Mycobiology, 2017, 45(2): 84-89.

[51] Wang Y, DiGuistini S, Wang T C T, et al. *Agrobacterium*-mediated gene disruption using split-marker in *Grossmannia clavigera*, a mountain pine beetle associated pathogen[J]. Current

Genetics, 2010, 56(3): 297-307.

[52] de Boer P, Bronkhof J, Dukik K, et al. Efficient gene targeting in *Penicillium chrysogenum* using novel *Agrobacterium*-mediated transformation approaches[J]. Fungal Genetics and Biology, 2013, 61: 9-14.

[53] Krenek P, Samajova O, Luptovciak I, et al. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: principles, methods and applications [J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(6): 1024-1042.

[54] Nødvig C S, Nielsen J B, Kogle M E, et al. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133085.

[55] Pohl C, Kiel J, Driessen A J M, et al. CRISPR/Cas9 based genome editing of *Penicillium chrysogenum* [J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(7): 754-764.

[56] Schuster M, Schweizer G, Reissmann S, et al. Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system [J]. Fungal Genetics and Biology, 2016, 89: 3-9.