

香蕉枯萎病菌内源报告基因 *Foc4carS* 的鉴定及其应用

彭 军^{1,2}, 曾凡云^{1,2}, 王艳玮¹, 漆艳香¹, 丁兆建³, 王少伶¹, 谢艺贤¹, 张 欣^{1*}

1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室/海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海南海口 571101; 2. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572000; 3. 琼台师范学院生物科学系, 海南海口 571127

摘 要: 香蕉枯萎病是由尖孢镰刀菌古巴转化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc) 引起的香蕉毁灭性土传病害, 其中 4 号生理小种 (Foc4) 能感染几乎所有的香蕉品系, 危害最严重。*carS* 基因通过调控下游 *car* 结构基因参与调控镰刀菌类胡萝卜素的生物合成, 本研究克隆鉴定了 *Foc4carS* 基因 (FOIG_05085), *Foc4carS* 蛋白具有典型的 RING-finger 蛋白结构域。利用分割标记法 (Split-marker PCR) 获得 *Foc4carS* 基因的融合片段, 同时构建含有 *Foc4carS* 基因 sgRNA591 序列的 pUC-*fFuCas9*-HTB_{NLS}-*hph*-*Foc4carS* 基因编辑载体, 通过 PEG 介导的原生质体转化获得该基因的敲除突变体、回补突变体以及基因编辑敲除体, 并对敲除和回补突变体的生物学特性和致病力进行分析。结果显示: Δ *Foc4carS* 突变体的菌落直径、产孢量和致病力等生物学表型与野生菌株 Foc4 无显著差异, 而 Δ *Foc4carS* 突变体菌落颜色呈深橙色, *Foc4carS* 基因的缺失影响了次生代谢产物类胡萝卜素的生物合成; 基因编辑的 Δ *Foc4carS* (HDR) 突变体不论是再生筛选板还是继代后的 PDA 平板, 其菌落均出现典型的深橙色, 表明 *Foc4carS* 可作为内源报告基因, 在香蕉枯萎菌 Foc4 中进行基因质粒型 CRISPR/Cas9 编辑可行。

关键词: 香蕉枯萎菌 Foc4; *Foc4carS* 基因; 类胡萝卜素; 基因敲除; CRISPR/Cas9 基因编辑

中图分类号: S436.68 文献标志码: A

Identification and Applification of an Endogenous Reporter Gene *Foc4carS* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4

PENG Jun^{1,2}, ZENG Fanyun^{1,2}, WANG Yanwei¹, QI Yanxiang¹, DING Zhaojian³, WANG Shaoling¹, XIE Yixian¹, ZHANG Xin^{1*}

1. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572000, China; 3. Department of Biological Science, Qiongtai Normal University, Haikou, Hainan 571127, China

Abstract: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), the causal agent of *Fusarium* wilt (Panama disease), is one of the most devastating diseases of banana (*Musa spp.*). The Foc race 4 (Foc4) is currently known as a major concern in global banana production. *carS* is involved in the biosynthesis of *Fusarium* carotenoid by regulating downstream *car* structural genes. In this study, *Foc4carS* (FOIG_05085) was cloned and identified. *Foc4carS* had a typical RING-finger protein domain. The fusion fragment of *Foc4carS* was obtained by using Split-marker PCR, and the pUC-*fFuCas9*-HTB_{NLS}-*hph*-*Foc4carS* gene editing vector containing the sequence of sgRNA591 of *Foc4carS* was constructed, the PEG-mediated protoplast transformation was used to obtain the knockout mutants, the complement mutants and the gene-editing mutants. The biological characteristics and pathogenicity of the knockout mutants and the complement mutants were

收稿日期 2023-09-07; 修回日期 2023-10-08

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 322RC756); 中国热带农业科学院国家热带农业科学中心科技创新团队项目 (No. CATASCXTD202308); 国家现代农业产业技术体系项目 (No. CARS-31)。

作者简介 彭 军 (1978—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 植物病理学。*通信作者 (Corresponding author): 张 欣 (ZHANG Xin), E-mail: zhxpipi@163.com。

analyzed. The results showed that the colony diameter, sporulation and pathogenicity of $\Delta Foc4carS$ mutants were not significantly different with wild strain Foc4, but the colony color of $\Delta Foc4carS$ mutant was dark orange, deletion of the *Foc4carS* gene affected the biosynthesis of the secondary metabolite carotenoid, and gene-edited $\Delta Foc4carS$ (HDR) mutants showed typical dark orange coloration in both regenerative screening plates and subcultured PDA plates. The results indicated that *Foc4carS* could be used as an endogenous reporter gene to perform gene plasmid CRISPR/Cas9 editing in *F. oxysporum* f. sp. *cubense* Foc4.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4; *Foc4carS*; carotenoid; gene knockout; CRISPR/Cas9 gene editing system

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.05.001

镰刀菌属 (*Fusarium*) 真菌是主要的植物病原菌, 能够产生多种次生代谢产物, 次生代谢产物可以分为聚酮类 (黄色镰刀菌素、伏马毒素和玉米赤霉烯酮等)、非核糖体多肽类 (铁载体等) 和萜类 (单端孢霉烯和类胡萝卜素等) 3 种主要的类型^[1-2]。在萜类化合物中, 类胡萝卜素生物合成的主要产物是羧基叶黄素链孢霉黄素 (carboxylic xanthophyll neurosporaxanthin, NX), 由香叶酰焦磷酸盐通过 *carRA*、*carB*、*carT*、*carD* 四种结构基因编码不同的酶参与类胡萝卜素的生物合成, 类胡萝卜素的生物合成相关基因受到光照的正调控表达^[3-6]。此外, 这些真菌还产生少量的 β -胡萝卜素 (β -carotene), β -胡萝卜素可能被 CarX 加氧酶裂解产生视网膜, 即视紫红质的发色团^[7-8]。

carS 基因通过调控下游 *car* 结构基因参与调控镰刀菌类胡萝卜素的生物合成。在水稻恶苗病菌 (*Fusarium fujikuroi*) 中利用化学诱变剂 [甲基硝基亚硝基胍 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)] 首次获得了类胡萝卜素过量表达的 *carS* 突变体, *carS* 突变体菌落呈深橙色^[9]。*carS* 基因在结构和功能上保守, 将水稻恶苗病菌 (*F. fujikuroi*) 的 *carS* 基因回补到 *F. oxysporum* 的 *carS* 突变体中, 可以恢复类胡萝卜素的生物合成^[4]; 在尖孢镰刀菌番茄专化型 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* strain 4287, Fol) 上也鉴定到编码 RING-finger 的 *carS* 基因, 敲除 *carS* 后的突变体菌株出现深橙色菌落颜色, *carS* 基因通过负调控下游 *car* 结构基因控制类胡萝卜素的生物合成^[5]。此外, *carS* 受到上游 lncRNA *carP* 的负调控表达^[10]。敲除 *carP* 后 *carS* 上调表达, 突变株出现白化表型, 通过转录组测序以及重新导入 *carP* 到敲除突变体的表型分析表明, *carP* 只有在插入 *carS* 上游表型才能够恢复, 因此, *carP* 是顺式调控因子, 通过负调控 *carS* 基因参与调控镰刀菌属 *Fusarium* 的类胡萝卜素生物合成^[11]。在有光照的情况下,

carS 的 mRNA 水平更高, 氮饥饿无明显变化, 在热休克或氧化应激后, *carS* 的 mRNA 水平明显下降, 这表明存在不同的激活机制。*CarS* 突变体的孢子比野生型的孢子对 H_2O_2 的抗性更强, 然而, 该突变体在生长水平上表现出更强的 H_2O_2 敏感性, 这可能是由于 *CarS* 参与调节具有过氧化氢酶结构域的基因^[12]。

CRISPR/Cas9 是一种存在于细菌和古菌中保守的获得性免疫防御机制, 近年来已被开发成为一种方便灵活的基因组编辑技术, 可直接在基因组上进行 DNA 序列的敲除、插入、定点突变以及组合编辑等^[13-15]。王艳玮等^[16]在香蕉枯萎菌 Foc4 中克隆鉴定出 *Foc4Bik1* 基因, 通过同源重组修复 (homology directed repair, HDR) 的方式进行 *Foc4Bik1* 基因编辑, 获得 $\Delta Foc4Bik1$ (HDR) 基因编辑敲除子, 该 $\Delta Foc4Bik1$ (HDR) 基因编辑敲除子呈现白色菌落表型。本研究以香蕉枯萎菌 Foc4 为研究对象, 通过获得 *Foc4carS* 基因的敲除和回补突变体, 测定突变体的生物学表型和致病力, 明确 *Foc4carS* 基因功能, 同时构建以 *Foc4carS* 为靶标基因的体内表达 Cas9 和 sgRNA 的质粒型 CRISPR/Cas9 基因编辑体系, 并以此评估在香蕉枯萎菌 Foc4 中基因编辑的可行性, 为香蕉枯萎菌的分子生物学研究提供有力的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株、载体、香蕉品种和引物 香蕉枯萎病菌 4 号生理小种 (*F. oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Foc4), 由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带果树病害研究组鉴定保存; 回补载体 pYF11 由南京农业大学张海峰教授课题组惠赠, 载体 pKOV21 由华中农业大学植物科学技术学院陈小林教授课题组惠赠; 试验接种

的香蕉品种为巴西蕉（*Musa* AAA Cavendish cv. Brazil），购自中国热带农业科学院种苗组培中心；PCR 引物由北京六合华大基因科技有限公司合成（PAGE 纯化，表 1）。

表 1 引物序列
Tab. 1 Sequence of primers

引物名称 Primer name	序列（5′–3′） Sequence (5′–3′)	功能 Function
carS-U-F	TGACTCGAGAGCTCCAGGGTAT	For construct the upstream fragment
carS-NEO-U-R	GAAATTGTAAGCGTTAATCTAGA ACTCTTCGTTGTGTCGTAGCGG	
carS-NEO-D-F	CCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA TGCTTGCCCTACTATCTCTCGC	For construct the downstream fragment
carS-D-R	CTCCACAAGACCCAGCACCTAA	
carS-N-F	CCTCGTCTCTAGGTGCTTCTATTC	For construct the upstream fragment with <i>NEO</i>
NEO-R1	GAGCAAGGTGAGATGACAGGAG	
NEO-F1	CACCACTCGATCCGTCACCAAC	For construct the downstream fragment with <i>NEO</i>
carS-N-R	CACTGGCTACTATGGACACAGGA	
carS-outside-1F	CGGCCATATTCATGCACTCGAC	Primers for validation knockout mutants
carS-outside-2609R	AGATGCCTCCCAACCGAATCAA	
carS-inside-1F	CACCACCTCCTGATGCTGATGA	Primers for the full length of neomycin gene
carS-inside-785R	TGGAGATGTCTGGTGTTGGTTCA	
NEO-F	TCTAGATTAACGTTACAATTTC	
NEO-R	TCAGAAGAAGTCGTCAAGAAGG	
HYG-pYF11-PgpdA-F	CTACAAAATGAAGCACAGATGCTTCGTTGGGCTGCAG CTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGT	Primers for <i>Hph</i> cassette into pYF11 vector
HYG-pYF11-PgpdA-R	TAGTATTTATTTAAGTATTGTTTGTGCACTTGCAGGCCT CCCGGTCGGCATCTACTCTAT	
carS-Com-native-1F	CACCGCGGTGGCGCCGCTCTAGAACTAGT TGTCATCCATCCTAGCCCGTCCC	For construct the complemental fragment
carS-Com-3414R	CCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCAC ATCAGAGGATTGTGCAGCCGTGGA	
HYG-probe-1F	TTCAGCTTCGATGTAGGAGGGC	Primers for validation complemental mutants
HYG-probe-598R	CCAGAAGAGGATGTTGGCGACC	
pCT74-sGFP-123F	CTGACCCTGAAGTTCATCTGC	
pCT74-sGFP-468R	GCTTGTCGGCCATGATATAGA	
carS-qPCR-F	CGAATGCGTCAACAGAGTGT	Specific primers of <i>carS</i> for qRT-PCR
carS-qPCR-R	GATGTGCCCAGGAGTCGATA	
carRA-qPCR-F	CATCCAGCGCGAAGTTGTC	Specific primers of <i>carRA</i> for qRT-PCR
carRA-qPCR-R	CGCGCGATATTGACGTATTG	
carB-qPCR-F	ACCCTTCACATGGCAAGAGA	Specific primers of <i>carB</i> for qRT-PCR
carB-qPCR-R	GCACCAGCGAAGTACAAGTT	
Actin-F	GAGAACGAGCGTGTCTTGATTGAGCC	Specific primers of <i>Actin</i> for qRT-PCR
Actin-R	TTTCCTCCGCAGAATGAAGAAGGACTC	
5SrRNA-U-F-EcoRI	GTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTC GATGACAAATTCAACAACTC	Construction of 5SrRNA-Foc4carS-sgRNA591 sequence
carS-sgRNA591-R	CCAGGCGATAAGTGGCGATACATACAACAG CGGGGATTCTG CTGGT	
carS-sgRNA591-F	TATCGCCACTTATCGCCTGG GTTTATAGAGCTAGAAATAGCA	To construct the HDR donor plasmid of Homology directed repair
5SrRNA-U-R-EcoRI	TCGCGAGGTACCGAGCTCGAATT ATTAAGGTTGGCAAGTGCAGGA	
pYF11-carS-HDR-F1	ACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACTCAAATTGGTT TCCCAGTTGTCAATCCATCCT	
carS-LB-R1	GCGAGAGATAGTAGGGCAAGCA ACTCTTCGTTGTGTCGTAGCGG	
carS-RB-F2	CCGCTACGACACAACGAAGAGT TGCTTGCCCTACTATCTCTCGC	Primers for validation of $\Delta Foc4carS$ (HDR) gene editing mutants
pYF11-carS-HDR-R2	GTGCGCAGAGGAGCCTGAATGTTGAGTGGAATGATG CACTGGCTACTATGGACACAGGA	
PgpdA-2648F	TGTGAAGCCAGGGGTGTATAGC	
Cas9-424R	GCTTCTTGCGAAGGTGGTAG	
pRS-marker	CGGCATCAGAGCAGATTGTA	
gRNA-R	CAAGTTGATAACGGACTAGC	

1.1.2 主要试剂 DNA 普通聚合酶 (2×Taq Master Mix Dye Plus, P112-1)、DNA 高保真聚合酶 (Phata Max Super-fidelity DNA Polymerase, P505-d2)、DNase I (EN401)、反转录酶试剂盒 (HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit, R111-02)、qRT-PCR 试剂盒 (ChamQ SYBR qPCR Master Mix, Q311-03)、DNA 重组克隆试剂盒 (ClonExpress® II One Step Cloning Kit, C112-02) 等购自南京诺唯赞 (Vazyme) 生物科技股份有限公司; 质粒小量提取试剂盒 (Plasmid Mini Kit I, D6943-02) 和胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit, D2500-02) 购自 Omega Bio-Tek 公司; 溶壁酶 (Lysing enzymes from *Trichoderma harzianum*, L1412) 和崩溃酶 (Driselase™ from *Basidiomycetes sp.*, D9515-25G) 购自 Sigma 公司; 酵母转化试剂盒 (Alkali-Cation™ Yeast Transformation Kit, #112200200)、总 RNA 提取试剂盒 (Trizol Reagent, B610409-0100) 等购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.1.3 培养基和缓冲液 PDA 培养基: 马铃薯去皮 200 g, 切成土豆片后, 加入蒸馏水煮 25~30 min 后, 用 3 层纱布过滤, 加入 20.0 g 葡萄糖, 15.0 g 琼脂粉至滤液中, 定容至 1 L; LB 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, 氯化钠 10.0 g, ddH₂O 定容至 1 L, 调节 pH 至 7.0 (固体 LB 培养基加入 15.0 g 琼脂粉); YEPD 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母提取物 3 g, 葡萄糖 20 g, ddH₂O 定容至 1 L (固体 YEPD 培养基加入 15.0 g 琼脂粉); RM 再生培养基: 蔗糖 205.5 g, 酵母提取物 3.0 g, 葡萄糖 20.0 g, ddH₂O 定容至 1 L (固体 RM 培养基加入 15.0 g 琼脂粉)。

0.7 mol/L NaCl 缓冲液: 40.908 g NaCl, ddH₂O 定容至 1 L; 1 mol/L Tris (pH 7.5) 缓冲液: Tris Base 121.14 g, HCl 调节 pH 至 7.5, ddH₂O 定容至 1 L; STC 缓冲液: 1.2 mol/L 山梨醇, 10 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 50 mmol/L CaCl₂, ddH₂O 定容至 1 L; PTC 缓冲液: 40% PEG 3350, 10 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 50 mmol/L CaCl₂, ddH₂O 定容至 1 L。

1.2 方法

1.2.1 *Foc4carS* 在基因组的位置排列以及蛋白结构域分析 从 NCBI 数据库下载香蕉枯萎菌 *Foc4carS* 基因 (FOIG_05085) 序列, 利用在线软件 SMART (<http://smart.embl.de>) 分析 *Foc4carS*

蛋白的保守功能域。通过 Blastx 进行同源比对, 获得 *Foc4carS* 亲缘关系相近的蛋白序列, 利用 MEGA-X 软件构建系统进化树 (统计方法选用 Neighbor-Joining, 选用 Bootstrap method 进行系统发育检验, No. of Bootstrap Replications 为 1000 次; 替代模型选用 Jones-Taylor-Thornton (JTT) model)。

参考已发布的 *Foc4* 野生株基因组序列 (JH658279.1) 分析 *carS* 基因在 *Foc4* 基因组上与调控基因之间的相对位置。首先, 分析 *Foc4carS* 上游是否存在负调控 lncRNA *carP*, 以及与 *Foc4carS* 基因在基因组上的相对排列位置^[11]; 其次, 分析 *Foc4carS* 下游结构基因 *carRA*、*carB*、*carT*、*carD* 以及 *carX* 在基因组上的排列位置以及是否呈基因簇排列^[7]。

1.2.2 *Foc4carS* 基因敲除片段的构建 以香蕉枯萎菌 *Foc4* 的基因组 DNA 为模板, 分别用引物 *carS*-U-F/*carS*-NEO-U-R 和 *carS*-NEO-D-F/*carS*-D-R 扩增出 *Foc4carS* 的上、下游片段, 利用 Split-marker 重组方法^[17], 用引物 *carS*-N-F/NEO-R1 和 NEO-F1/*carS*-N-R 构建与新霉素的融合片段, 并用于后续的 *Foc4carS* 基因敲除。

1.2.3 PEG 介导的原生质体转化以及 $\Delta Foc4carS$ 敲除突变体的验证 香蕉枯萎菌 *Foc4* 原生质体转化及敲除突变体的验证参照文献[16, 18-19]。将含有部分新霉素抗性基因 *NEO* 序列的上、下游敲除片段 (3~5 μ g) 加入到含有 200 μ L *Foc4* 原生质体的 2.0 mL 离心管中, 轻柔混匀后, 冰上放置 30 min。向混合液中逐滴加入 200 μ L PTC, 轻柔混匀, 冰上放置 7 min; 再次逐滴加入 200 μ L PTC, 轻柔混匀, 冰上放置 7 min; 将约 700~800 μ L 原生质体混合液转移至 50 mL 圆底离心管中, 逐滴加入 800 μ L PTC, 轻柔混匀, 室温放置 10 min。将预冷的 STC 溶液加入到混合液至 25 mL, 轻柔混匀后, 4 $^{\circ}$ C, 5000 r/min 离心 10 min, 小心去除上清液; 加入 RM 液体培养基 5 mL, 充分混匀, 转至 28 $^{\circ}$ C, 100 r/min 摇培 12~16 h。加入 30 mL 含有 200 μ g/mL 新霉素和 50 μ g/mL 链霉素的 RM 固体培养基, 轻柔混匀后倒入 5 个培养皿, 室温静置 10 min, 向 5 个平板内再分别倒入 15 mL RM 固体培养基 (200 μ g/mL 新霉素和 50 μ g/mL 链霉素), 室温静置 30 min, 随后转入 28 $^{\circ}$ C 培养箱中, 倒置培养 3~7 d, 长出转化子后, 将转化子转接于

PDA 培养基(200 $\mu\text{g/mL}$ 新霉素和 50 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素)继续进行抗性筛选, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~5 d, 长出菌落后收集菌丝, 提取转化子基因组 DNA, 用 carS-outside-1F/carS-outside-2609R、carS-Inside-1F/carS-inside-785R、NEO-F/NEO-R 等 3 对引物对转化子进行 PCR 验证。

1.2.4 *Foc4carS* 基因回补载体的构建以及回补转化子的获得 以 pKOV21 质粒 DNA 为模板, 使用引物 HYG-pYF11-PgpdA-F/HYG-pYF11-PgpdA-R 扩增 *Hph* 抗性基因片段, 以 pYF11 为骨架, 用 *Pst* I 单切线性化, 将 *Hph* 抗性基因片段连入 pYF11, 获得载体 pYF11-*Hph*。以 *Foc4* 基因组 DNA 为模板, 引物 carS-Com-native-1F/carS-Com-3414R 进行 PCR 扩增, 扩增片段 *Foc4carS*-Com 长度为 3414 bp, 含有 *Foc4carS* 基因原始启动子序列(1380 nt)和 ORF 序列(1973 nt, 去除终止密码子)。

将载体 pYF11-*Hph* 用 *Xho* I 单切线性化, 将 3.4 kb 的扩增片段 *Foc4carS*-Com 和 pYF11-*Hph* 按照 9:1 比例共转化酵母感受态, 在酵母 SD-Trp 培养基长出单菌落后, 利用 pYF11 骨架上的通用引物 M13F(-47)与 *Foc4carS* 基因特异反向引物 carS-inside-785R 组合, 进行菌落 PCR 验证, 将阳性单克隆提取酵母质粒 DNA, 转化大肠杆菌 DH5 α , 进行菌落 PCR 后获得回补载体 pYF11-*Hph*-*Foc4carS*。

Δ Foc4carS 的基因回补过程的原生质体制备和 PEG 介导转化参照方法 1.2.3, 将 15~20 μg 的回补载体 pYF11-*Hph*-*Foc4carS* 与 200 μL *Δ Foc4carS* 基因敲除突变体原生质体混合, 在含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素的 RM 再生培养基进行抗性筛选, 转化子用 carS-inside-1F/carS-Inside-785R、HYG-probe-1F/HYG-probe-598R、pCT74-sGFP-123F/pCT74-sGFP-468R 等 3 对引物进行 PCR 验证。

1.2.5 *Δ Foc4carS* 突变体生长特性分析 参照王艳玮等^[16]的方法对 *Δ Foc4carS* 突变体进行菌落形态观察、菌落直径的测定、分生孢子形态显微观察和分生孢子产量测定等, 试验重复 3 次。

1.2.6 *Foc4carS* 基因以及类胡萝卜素合成途径 carRA 和 carB 的定量表达分析 收集 *Foc4* 和 *Δ Foc4carS* 分别接种于 PDA 培养基上培养 5 d 的菌丝, 液氮处理 10 min 后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。使用 Trizol 法提取样品的总 RNA, 按照 HiScript[®]

III Reverse Transcriptase 操作说明书进行 cDNA 合成, 参考 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 产品说明书, 采用 20 μL 体系, 分别使用 carS-qPCR-F/carS-qPCR-R、carRA-qPCR-F/carRA-qPCR-R、carB-qPCR-F/carB-qPCR-R 等 3 对引物进行 qRT-PCR, 以 *Foc4* 的 *Actin* 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 值比较分析 *car* 基因在 *Foc4* 和 *Δ Foc4carS* 不同光暗处理下的表达量。

1.2.7 *Δ Foc4carS* 突变体致病力分析 *Δ Foc4carS* 突变体致病力测定参照王艳玮等^[16]的方法, 接种 30~40 d 后, 参考 MOHAMED 等^[20]的病情调查分级标准, 统计发病情况并拍照。

1.2.8 *Foc4carS* 为靶标基因的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体设计及构建 参照 SHI 等^[14]和王艳玮等^[16]的方法, 以水稻恶苗病菌 (*F. fujikuroi*) 的基因编辑载体 pUC-*fFuCas9*-HTB_{NLS}-*hph* (Addgene No. 121092), 设计并构建以 *Foc4carS* 为靶标基因的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体。

首先通过在线 gRNA 序列设计网站 (<http://grna.ctegd.uga.edu/>和 <http://crispor.tefor.net/>), 确定 gRNA 的序列(*Foc4carS*-gRNA591: TATCGCC ACTTATCGCCTGGCGG)。构建 5SrRNA-*Foc4carS*-sgRNA591 序列: 首先人工合成 263 nt 的 *Ff5SrRNA-fcc1*-sgRNA 基因序列^[14], 以此为 DNA 模板进行 2 轮 PCR 构建 5SrRNA-*Foc4carS*-sgRNA591。第一轮 PCR 分别用引物 5SrRNA-U-F-EcoRI/carS-sgRNA591-R、carS-sgRNA591-F/5SrRNA-U-R-EcoRI 扩增 5SrRNA-*Foc4carS*-sgRNA591 的上、下两端序列; 第二轮 PCR 用引物 5SrRNA-U-F-EcoRI/5SrRNA-U-R-EcoRI 进行融合 PCR 扩增, 得到 5SrRNA-*Foc4carS*-sgRNA591 序列。

其次, 将 5SrRNA-*Foc4carS*-sgRNA591 同源重组导入编辑载体。pUC-*fFuCas9*-HTB_{NLS}-*hph* 载体质粒 DNA 用 *EcoR* I 酶切后, 按照 ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit 说明书, 将 5SrRNA-*Foc4carS*-sgRNA591 序列导入载体 pUC-*fFuCas9*-HTB_{NLS}-*hph*, 获得靶向 *Foc4carS* 的 pUC-*fFuCas9*-HTB_{NLS}-*hph*-*Foc4carS* 基因编辑载体, 该载体采用体内表达的 Cas9 和 sgRNA 质粒进行基因编辑。

最后, 利用 pYF11 载体构建同源重组修复 (homology directed repair, HDR) 的 HDR 供体质粒 pYF11-*Foc4carS*-HDR。第一步, 采用 2 轮 PCR 方法融合扩增 *Foc4carS*-HDR 序列。第一轮 PCR

分别采用引物 pYF11-carS-HDR-F1/carS-LB-R1、carS-RB-F2/pYF11-carS-HDR-R2 扩增 *Foc4carS* 基因的上游 1302 bp、下游 1220 bp 同源序列；第二轮 PCR 采用引物 pYF11-carS-HDR-F1/pYF11-carS-HDR-R2 进行 overlap PCR 扩增上、下两段序列成为 *Foc4carS*-HDR 序列。第二步，*Foc4carS*-HDR 序列导入 pYF11 构建成 pYF11-*Foc4carS*-HDR 载体作为基因编辑的 HDR 模板。将 pYF11 载体 DNA 经 *Xho* I 线性化，*Foc4carS*-HDR 序列和 pYF11-*Xho* I 线性 DNA 混合共转化 XK1-25 酵母细胞，参照酵母转化试剂盒（Alkali-Cation™ Yeast Transformation Ki, t#112200200）说明书进行转化，以构建重组供体质粒 pYF11-*Foc4carS*-HDR，从阳性酵母 XK1-25 转化子中提取质粒，并将其转移到大肠杆菌 DH5 α 菌株中扩繁，PCR 检测大肠杆菌 DH5 α 中的重组质粒后测序再次验证，然后提取 pYF11-*Foc4carS*-HDR 质粒备用。

1.2.9 香蕉枯萎菌 *Foc4* 的 CRISPR/Cas9 基因编辑 分别取 5 μ g pUC-*fFuCas9*-HTB_{NLS}-*hph*-*Foc4CarS*、供体质粒 pYF11-*Foc4carS*-HDR 混入 200 μ L 1×10^7 个/mL 的 *Foc4* 原生质体，轻轻混匀后冰浴 30 min，采用含有 100 μ g/mL 潮霉素 HYG 抗性的 RM 再生培养基进行抗性筛选，其他步骤与 1.2.3 的原生质体转化方法一致。利用 carS-outside-1F/carS-outside-2609R、carS-inside-1F/carS-inside-785R、PgpdA-2648F/Cas9-424R、pRS-marker/gRNA-R 等 4 对引物对编辑转化子进行 PCR 验证，基因编辑后的阳性转化子筛选方法与基因敲除阳性转化子筛选方法一致，差别在于基因敲除突变体 *carS* 基因位点被抗性基因 *HYG* 取代，而基因编辑后的突变体中 *carS* 基因没有被抗性基因取代位点，而是被重组删除。

1.3 数据处理

采用 WPS Office 和 SPSS 22.0 软件对试验数据进行统计分析并作图，采用单因素方差分析中的 Duncan's 检验进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 *Foc4carS* 的基因组特性以及进化分析

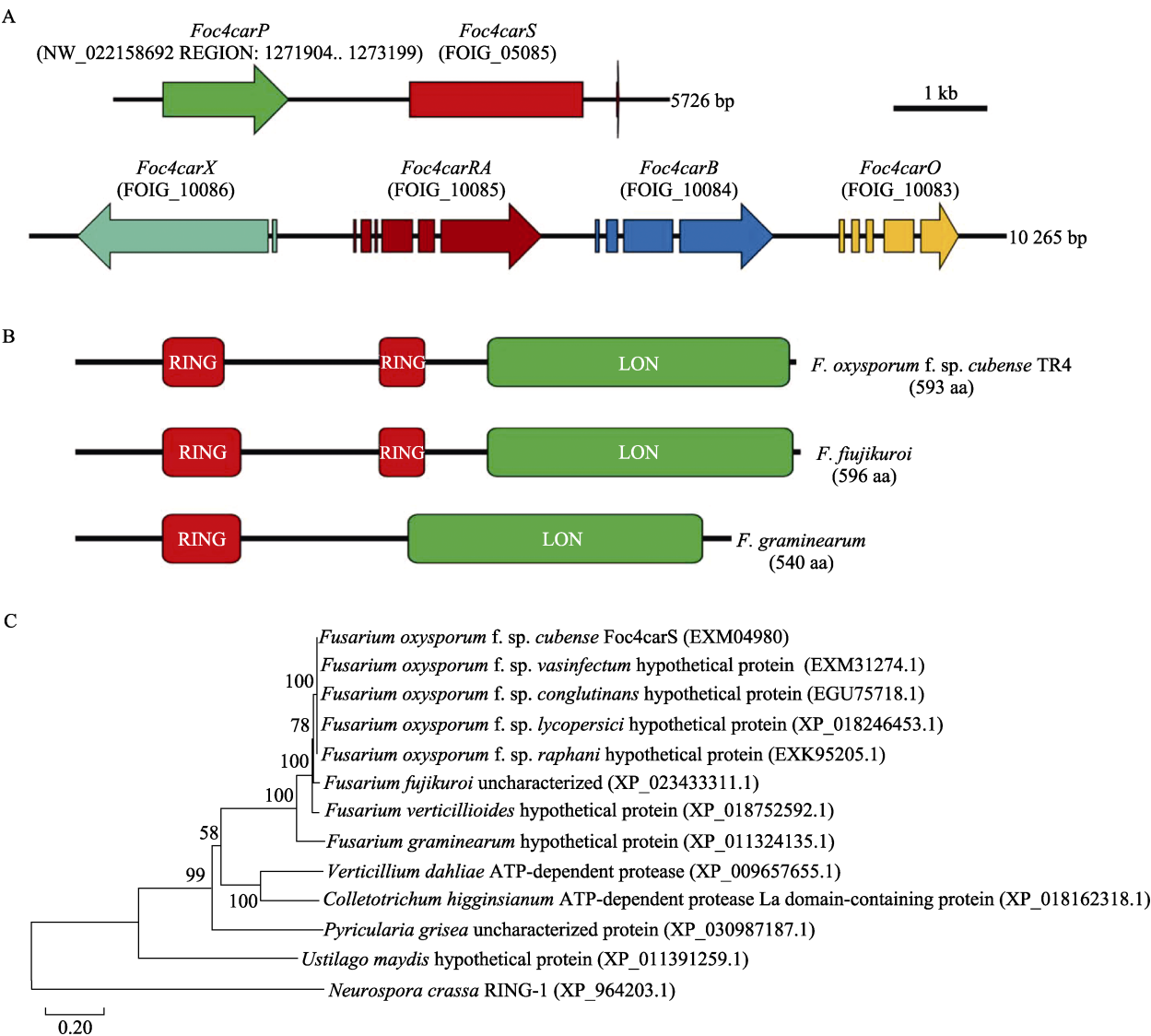
在 *Foc4* 基因组中通过同源比对发现，*Foc4carS* 基因（FOIG_05085）的 CDS 全长为 1776 nt，包含 2 个内含子，编码 592 个氨基酸。在 *Foc4carS* 基因上游 1295 nt 处存在长度为 1296 nt 的 lncRNA *Foc4carP*，其基因组排列与水稻恶苗病菌（*F.*

fujikuroi）中的一致，说明在 *Foc4* 中，*Foc4carS* 也可能受到上游 *Foc4carP* 的负调控（图 1A）。*Foc4* 中 *car* 基因的排列与前期尖孢镰刀菌番茄转化型（*Fol*）和尖孢镰刀菌棉花专化型（*Fov*）上的报道一致，*Foc4carX*/*Foc4carRA*/*Foc4carB*/*Foc4carO* 一起排列在 *Foc4* 的基因组上（图 1A）。香蕉枯萎菌 *Foc4carS* 与水稻恶苗病菌（*F. fujikuroi*）、禾谷镰刀菌（*F. graminearum*）等含有相同的蛋白功能域，除了含有典型的 RING-finger 蛋白结构域外，还含有 N 端依赖 ATP 的 LON 蛋白酶结构域 [ATP-dependent protease Lon (La) protease]（图 1B）。系统发育进化树结果显示：香蕉枯萎菌 *Foc4carS* 蛋白与尖孢镰刀菌不同专化型的同源性最高，聚为一簇，而与大丽轮枝孢（*Verticillium dahliae*）、希金斯刺盘孢（*Colletotrichum higginsianum*）、稻瘟病菌（*Pyricularia grisea*）等病原真菌的 *carS* 蛋白亲缘关系较远，说明香蕉枯萎菌的 *Foc4carS* 蛋白与其他尖孢镰刀菌专化型的 *carS* 蛋白具有相近的亲缘关系（图 1C）。

2.2 *Foc4carS* 基因敲除和回补突变体的验证

以 *Foc4* 基因组 DNA 为模板，分别用引物 carS-U-F/carS-NEO-U-R 和 carS-NEO-D-F/carS-D-R 扩增出上游、下游片段，获得上游片段 1595 bp，下游片段 1582 bp。利用融合 PCR 构建出敲除片段，以上游片段和新霉素全长基因为模板，用引物 carS-N-F/NEO-R1 扩增出上游与新霉素融合片段，大小为 2010 bp；以下游片段和新霉素全长基因为模板，用引物 NEO-F1/carS-N-R 扩增出下游与新霉素融合片段，大小为 2196 bp。

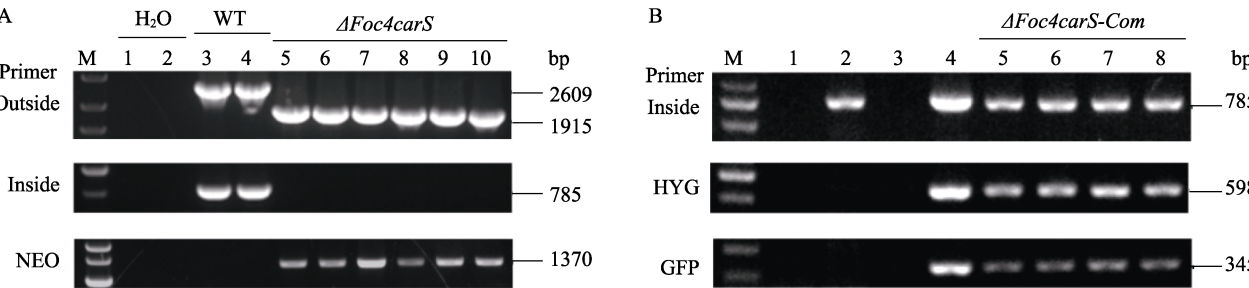
通过 PEG 介导的原生质体转化 *Foc4* 并获得具有新霉素 NEO 抗性的 Δ *Foc4carS* 候选转化子，利用 carS-outside-1F/carS-outside-2609R、carS-inside-1F/carS-inside-785R、NEO-F/NEO-R 等 3 对引物对转化子进行 PCR 验证，得到 6 个阳性突变体。其中 Outside 引物（carS-outside-1F/carS-outside-2609R）从 Δ *Foc4carS* 敲除突变体中扩增出 1915 bp，而野生型 *Foc4* 扩增片段大小为 2609 bp；Inside 引物（carS-inside-1F/carS-inside-785R）从 *Foc4* 中扩增出 785 bp 特异条带，而 Δ *Foc4carS* 敲除体未能扩增出特异条带；抗性基因新霉素 NEO 的 PCR 扩增结果显示，野生株 *Foc4* 中未能扩增出 1370 bp 条带，而在 Δ *Foc4carS* 敲除突变体中均能扩增到 1370 bp 条带，此 PCR 检测结果表明 *Foc4carS* 基因成功被新霉素基因替换（图 2A）。



A: *Foc4carS* 在 *Foc4* 基因组的相对位置；B: 香蕉枯萎菌 *Foc4carS* 蛋白结构域分析；C: *Foc4carS* 系统进化树分析。
A: The *Foc4carS* gene position relative to *car* genes in *Foc4* genome; B: Schematic representation of the conserved domain of *Foc4carS*;
C: Phylogenetic analysis of *Foc4carS*.

图 1 香蕉枯萎菌 *Foc4carS* 的基因组排列、蛋白结构域预测及进化树分析

Fig. 1 Genome alignment, protein domain prediction and phylogenetic tree analysis of *Foc4carS*



A: $\Delta Foc4carS$ 敲除突变体的 PCR 验证；B: $\Delta Foc4carS$ 回补突变体的 PCR 验证，1: H₂O；2: *Foc4*；3: $\Delta Foc4carS$ ；4: pYF11-*Hph-Foc4carS*。
A: Validation of the $\Delta Foc4carS$ gene-knockout mutants by PCR; B: Validation of the $\Delta Foc4carS$ complementary by PCR,
1: H₂O; 2: *Foc4*; 3: $\Delta Foc4carS$; 4: pYF11-*Hph-Foc4carS*.

图 2 $\Delta Foc4carS$ 基因敲除及回补突变体的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of $\Delta Foc4carS$ knockout and complementary mutants by PCR

构建的回补载体 pYF11-*Hph-Foc4carS* 通过 PEG 介导转化敲除突变体 ($\Delta Foc4carS$ -8) 原生质体, 经基因内部特异引物 *carS*-inside-1F/*carS*-inside-785R、pYF11-*Hph* 骨架上的抗性基因潮霉素 *Hph* 引物 HYG-probe-1F/HYG-probe-598R、绿色荧光蛋白 GFP 基因引物 pCT74-sGFP-123F/pCT74-sGFP-468R 等 3 对引物验证, 得到回补突变体 $\Delta Foc4carS$ -Com (图 2B)。

2.3 $\Delta Foc4carS$ 突变体的生物学表型分析

在 PDA 培养基上培养 5 d 后, $\Delta Foc4carS$ 敲除突变体出现橙色菌落, 野生型 *Foc4* 和回补突变体 $\Delta Foc4carS$ -Com 均为白色菌落, 菌落颜色差异明显。PDB 液体摇培 7 d 后, $\Delta Foc4carS$ 敲除突变体中也出现深橙色摇培菌液, 而 *Foc4* 和回补突变体 $\Delta Foc4carS$ -Com 则为白色菌液 (图 3A); 对敲除突变体 $\Delta Foc4carS$ 、回补突变体 $\Delta Foc4carS$ -Com 和野生型 *Foc4* 菌株的菌丝顶端形态以及分生孢子形态进行显微观察, 发现 *Foc4carS* 基因缺失对香蕉枯萎病菌的菌丝顶端形态 (图 3B) 和分生孢子形态 (图 3C) 均无明显影响; 同时, 敲除突变体 $\Delta Foc4carS$ 的菌落直径和产孢量与野生菌株 *Foc4* 相比均无显著差异 (图 3D, 图 3E)。 $\Delta Foc4carS$ 中类胡萝卜素过量表达出现深橙色表型, 说明 *carS* 基因有作为香蕉枯萎菌内源报告的特征和潜力。

2.4 香蕉枯萎菌 *Foc4* 中 *car* 基因在不同光照处理下的表达分析

为了揭示 *Foc4* 中类胡萝卜素的合成分别受到光诱导的正调控和 *carS* 的负调控机制, 本研究对 *Foc4* 和 $\Delta Foc4carS$ 的表型与主要 *car* 基因 (*carRA* 和 *carB*) 的 mRNA 表达进行了 qRT-PCR 关联分析。*Foc4* 和 $\Delta Foc4carS$ 突变体分别接种于 PDA 培养基上, 在光照、黑暗以及光暗交替培养 3 种条件下, 培养 5 d 后观察平板菌落表型, 同时对 *carS*、*carRA* 和 *carB* 基因的表达情况进行评估 (图 4)。结果显示, 野生型 *Foc4* 在光照条件下出现淡橙色, 而暗培养和光暗交替培养的平板颜色差异不大; $\Delta Foc4carS$ 突变体在光照条件下出现深橙色菌落颜色, 光暗交替条件下为橙色, 而暗培养条件下的菌落颜色为淡粉色, 颜色依次变淡 (图 4A); 而 *Foc4* 中的 *carS* 基因光照后诱导上调表达 (图 4B)。与此对应的是 *Foc4carRA*、*Foc4carB* 基因表达量也是依照光、光暗、暗培养顺序依次下调表达 (图 4C), 说明菌落颜色深浅

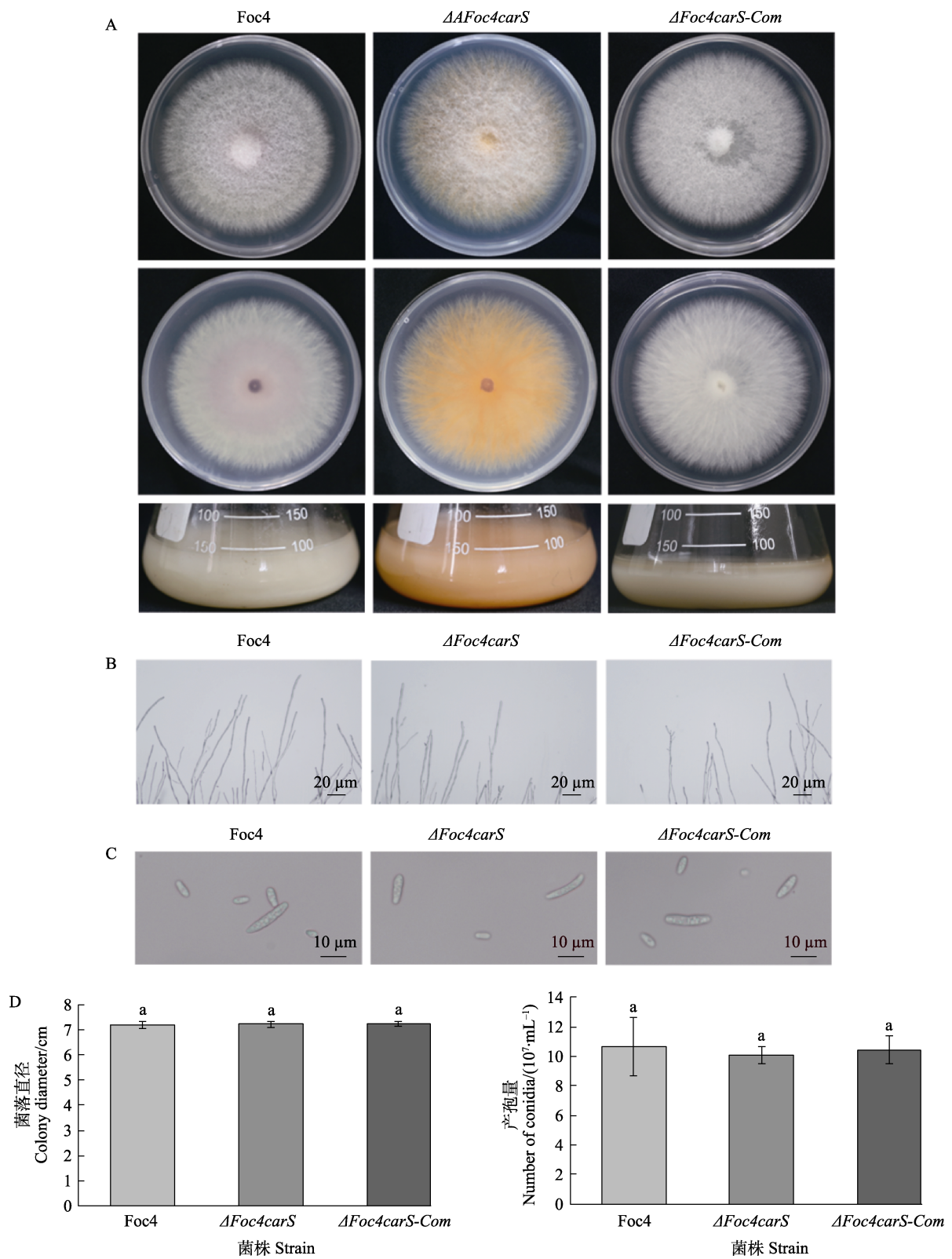
与 *car* 基因的表达水平一致。因此, *Foc4* 中类胡萝卜素的生物合成受到双重调控, 光照正调控表达和 *carS* 的负调控表达。

2.5 $\Delta Foc4carS$ 致病力测定

为明确 *Foc4carS* 基因对香蕉枯萎病菌致病力的影响, 采用盆栽伤根灌淋法对敲除突变体 $\Delta Foc4carS$ 、回补突变体 $\Delta Foc4carS$ -Com 和野生菌株 *Foc4* 进行了活体致病力测定。结果显示, 空白对照清水组的巴西蕉苗生长旺盛, 株高显著高于 *Foc4*、敲除突变体 $\Delta Foc4carS$ 以及回补突变体 $\Delta Foc4carS$ -Com。而敲除突变体 $\Delta Foc4carS$ 、回补突变体 $\Delta Foc4carS$ -Com 处理的巴西蕉苗发病情况与野生菌株 *Foc4* 处理的巴西蕉类似, 植株下层叶陆续出现黄叶, 植株矮化, 严重发病植株出现死株, 切开球茎观察, 球茎出现典型的坏死斑, 球茎褐化明显 (图 5A)。统计其发病病级, 结果显示敲除突变体 $\Delta Foc4carS$ 、回补突变体 $\Delta Foc4carS$ -Com 与野生株 *Foc4* 的病情指数无显著差异 (图 5B)。结果表明, *Foc4carS* 基因的缺失对 *Foc4* 的致病力并无影响, *Foc4carS* 基因仅参与次生代谢产物类胡萝卜素的生物合成, 并不参与调控病原菌的致病力。

2.6 *Foc4carS* 为靶标评估 CRISPR/Cas9 基因编辑的可行性

构建靶向 *Foc4carS* 的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体 pUC-*fFuCas9*-HTB_{NLS}-*hph-Foc4carS* (图 6A), 采用同源重组修复 (HDR) 的方式进行后续的基因敲除。将编辑载体 pUC-*fFuCas9*-HTB_{NLS}-*hph-Foc4carS* 质粒与 pYF11-*Foc4carS*-HDR 供体质粒混合后共转化香蕉枯萎病菌 *Foc4* 的原生质体 (图 6B), 经过潮霉素抗性筛选和再生培养获得 $\Delta Foc4carS$ (HDR) 基因编辑转化子, 在 PDA 平板上出现典型的深橙色菌落表型, 与野生型 *Foc4* 的白色菌落对比明显, 肉眼可辨别 (图 6C)。通过 4 对引物对基因编辑敲除转化子进行 PCR 检测, 结果显示: Outside 引物可以从野生菌株 *Foc4* 中扩增到 2609 bp 条带, 而 $\Delta Foc4carS$ (HDR) 中扩增得到 545 bp; Inside 引物只能从 *Foc4* 中扩增到 785 bp, 而 $\Delta Foc4carS$ (HDR) 无扩增条带。此外, *Cas9* 基因和 sgRNA 只能分别从 $\Delta Foc4carS$ (HDR) 中扩增获得 1310 bp 和 506 bp (图 6D)。结果表明, $\Delta Foc4carS$ (HDR) 基因编辑转化子中的 pUC-*fFuCas9*-HTB_{NLS}-*hph-Foc4carS* 基因编辑载体成功插入基因组中, 通过基因编辑方法成功将靶标基因 *Foc4carS* 敲除。

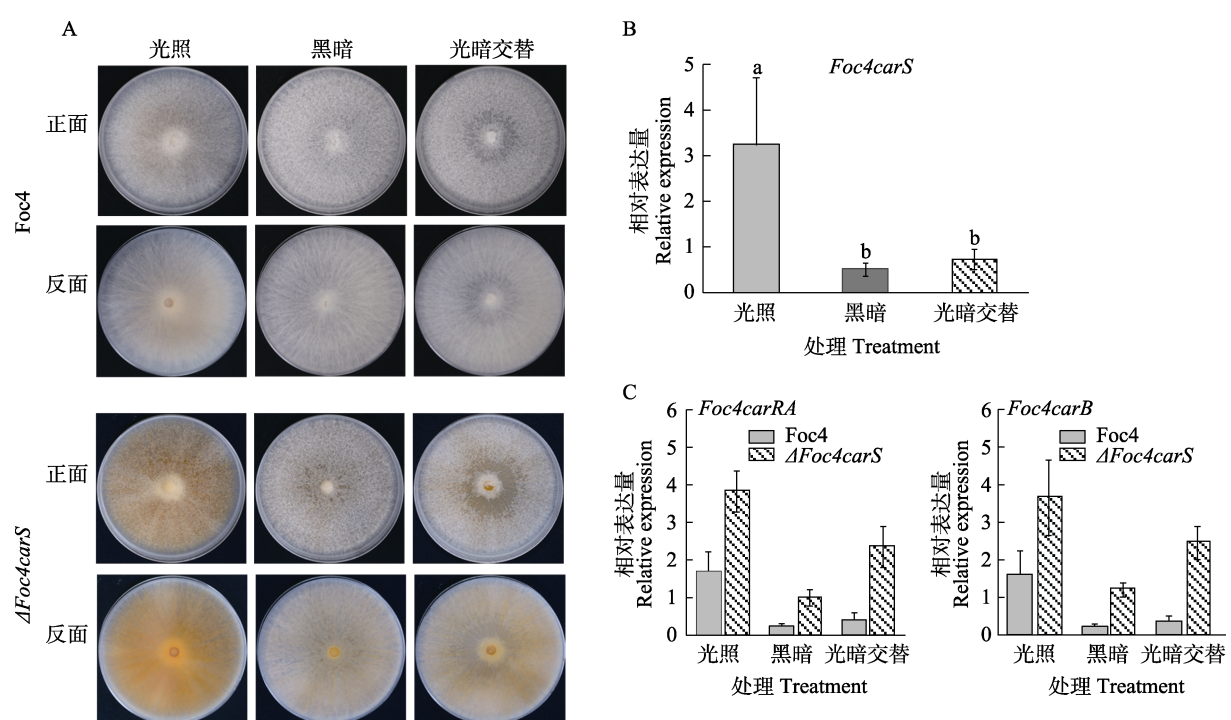


A: 平板菌落形态 (28 ℃, 5 d), 发酵液颜色 (28 ℃, 180 r/min, 7 d); B: 菌丝顶端形态; C: 分生孢子形态; D: 菌落直径; E: 产孢量。相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。

A: Colony morphology (28 ℃, 5 d) and the fermentation color (28 ℃, 180 r/min, 7 d); B: Mycelial tip morphology; C: Conidia morphology; D: Colony diameter; E: Number of conidia. Same lowercase letters indicate no significant differences ($P>0.05$).

图 3 $\Delta Foc4carS$ 基因敲除突变体的生物学表型

Fig. 3 Biological phenotypes of *Foc4* and $\Delta Foc4carS$ knockout mutants

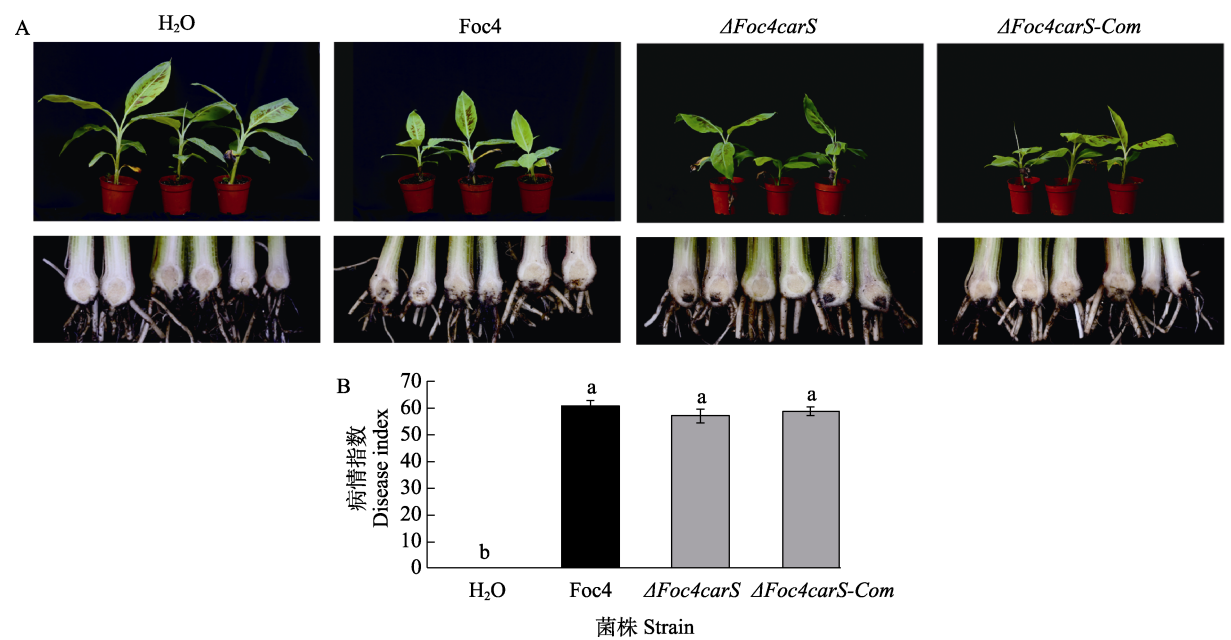


A: 菌落表型 (28 ℃, 5 d); B: *Foc4carS* 基因表达分析; C: *Foc4carRA* 和 *Foc4carB* 的基因表达分析。不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

A: Colony morphology (28 ℃, 5 d); B: Expression analysis of the *Foc4carS*; C: Expression analysis of *Foc4carRA* and *Foc4carB*. Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 4 在不同光照处理下 *car* 基因的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *car* genes under different light treatments

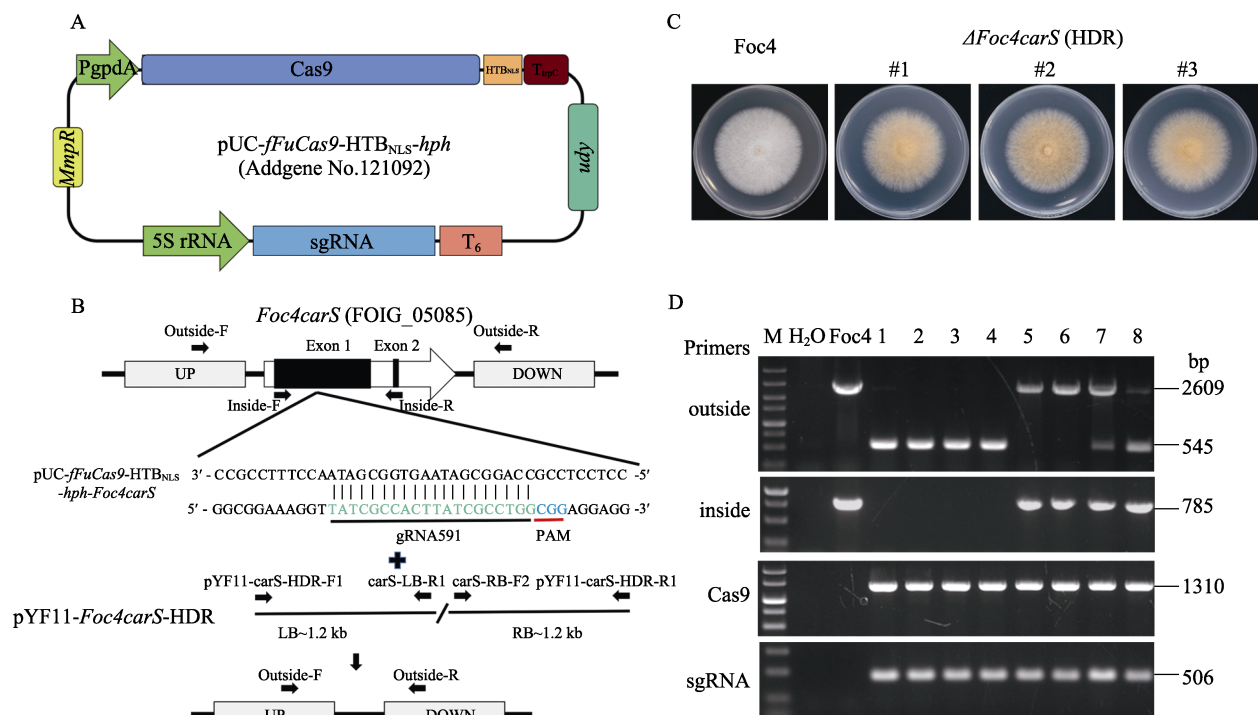


A: 野生株 *Foc4* 和 $\Delta Foc4carS$ 侵染巴西蕉后的发病症状; B: 野生株 *Foc4* 和 $\Delta Foc4carS$ 侵染巴西蕉苗的病情指数, 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

A: Symptoms of Brazil banana plantlets infected by wild-type *Foc4* and $\Delta Foc4carS$ knockout mutants, respectively; B: The disease indexes of the Brazil banana plantlets infected by *Foc4* and $\Delta Foc4carS$ knockout mutants, Difference lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 5 野生株 *Foc4* 和 $\Delta Foc4carS$ 突变体在巴西蕉苗的致病力测定

Fig. 5 Pathogenicity test of wild-type *Foc4* and $\Delta Foc4carS$ knockout mutants on banana plantlets (Musa AAA Cavendish cv. Brazil)



A: 基因编辑载体 pUC-fFuCas9-HTB-NLS-hph 示意图; B: *Foc4carS* 设计的 gRNA591 序列示意图; C: 基因编辑 $\Delta Foc4carS$ (HDR) 突变体的菌落形态; D: 基因编辑 $\Delta Foc4carS$ (HDR) 突变体的 PCR 验证。

A: Schematic diagram of gene editing vector of pUC-fFuCas9-HTB-NLS-hph; B: A schematic of the gRNA591 sequence designed for *Foc4carS*; C: Colony morphology of $\Delta Foc4carS$ (HDR) gene editing mutants; D: PCR validation of $\Delta Foc4carS$ (HDR) gene editing mutants.

图 6 *Foc4carS* 的 CRISPR/Cas9 基因编辑质粒示意图以及基因编辑突变体表型分析

Fig. 6 Schematic of CRISPR/Cas9 gene-editing plasmids for *Foc4carS* and and phenotype of $\Delta Foc4carS$ (HDR) gene editing mutants

3 讨论

香蕉枯萎病菌 *Foc4* 中类胡萝卜素的生物合成受到光和 *Foc4carS* 的共同调控。*Foc4* 中类胡萝卜素的生物合成受到 *Foc4carS* 的负调控表达。野生型 *Foc4* 菌落颜色是白色, 而 $\Delta Foc4carS$ 突变体出现了橙色菌落, 2 个主要的 *car* 结构基因 *Foc4carRA* 和 *Foc4carB* 无论是何种培养条件下, 在 *Foc4carS* 突变体中的表达水平均高于野生型 *Foc4*, 因此, *Foc4carS* 突变体是类胡萝卜素过表达突变体, 与前期的镰刀菌属 *Fusarium* 的研究^[5, 9] 结果一致, 说明 *Foc4carS* 负调控 *car* 结构基因参与 *Foc4* 类胡萝卜素的生物合成。

Foc4carS 以及 *car* 结构基因均受到光诱导上调表达。本研究中发现, 基因 *Foc4carS* 以及 *Foc4carS* 负调控的 *car* 结构基因 *Foc4carRA* 和 *Foc4carB* 均受到光照诱导上调表达, 且野生型 *Foc4* 中 *Foc4carRA* 和 *Foc4carB* 的表达量明显小于 $\Delta Foc4carS$ 突变体, 推测可能是野生型 *Foc4* 含有的 *Foc4carS* 基因受光照诱导上调表达后抑制调控的 *car* 结构基因的表达, 这说明了野生型 *Foc4*

中 *car* 结构基因表达量为什么低于 $\Delta Foc4carS$ 突变体, 也部分解释了野生型 *Foc4* 光照条件下 *Foc4carS* 上调表达而菌落依然可以过量表达类胡萝卜素而出现淡粉色的问题。前期研究表明, $\Delta carS$ 突变体是不依赖光诱导形成类胡萝卜素, 表型深橙色色素, 积累大量的链孢霉黄素 NX 和类胡萝卜素前体物质^[6-7]。本研究中的 $\Delta Foc4carS$ 突变体光照培养后, 比暗培养和光/暗培养的 $\Delta Foc4carS$ 突变体的菌落颜色更浓且呈深橙色, 而结构基因 *carRA*、*carB* 的上调表达幅度也比暗培养和光/暗交替培养的更大, 说明 $\Delta Foc4carS$ 突变体光照后 *car* 基因上调表达, 积累更多的链孢霉黄素从而使菌落颜色更深。因此, $\Delta Foc4carS$ 突变体的类胡萝卜素生物合成也受到光诱导表达调控。

在水稻恶苗病菌 (*F. fujikuroi*) 的研究表明 *carS* 作为胡萝卜素生物形成的负调控因子, 其调控作用本身也受到野生型菌株自身的调控, 保证适量的链孢霉黄素 NX 产生并受到光诱导调控^[21]。本研究中, 无论什么培养条件下, *Foc4* 中均保持

一定基础水平的类胡萝卜素含量,即使野生型 *Foc4* 在暗培养条件下, *Foc4carRA* 和 *Foc4carB* 结构基因仍然能够保持一定的表达量,使得 *Foc4* 维持一定水平的类胡萝卜素含量,保证一定的链孢霉黄素 NX 和类胡萝卜素前体物质,与前期的研究结果一致。

本研究鉴定的 *Foc4carS* 基因符合作为香蕉枯萎菌的内源报告基因:(1) *Foc4carS* 基因为单一拷贝基因;(2) 突变体表型容易分辨, $\Delta Foc4carS$ 突变株菌落颜色呈深橙色,与野生株的白色菌落差异明显;(3) *Foc4carS* 参与调控的表达产物能够定量测定, *Foc4carS* 参与类胡萝卜素的生物合成,含量可以量化测定;(4) *Foc4carS* 仅影响 *Foc4* 的次生代谢产物,对其致病力、菌落形态、分生孢子形态及产量等表型无影响。CRISPR/Cas9 基因编辑可以对基因组不同功能基因定向编辑,通过剪除 DNA 片段来敲除某基因的功能,或通过向基因组中插入新的片段引入新的功能,是研究基因功能的重要技术手段之一^[22]。*Foc4* 构建的质粒型基因编辑方法实用性高、成本低、操作更加方便。前期报道稻瘟菌中稳定表达携带 Cas9 的质粒会严重影响稻瘟菌的转化效率,可能 Cas9 蛋白对稻瘟菌有毒性作用^[23]。*Foc4* 的试验结果与稻瘟菌的结果不一致, Cas9 单独转化携带 Cas9 的空载体 pUC-*fFuCas9*-HTB_{NLS}-*hph* 到 *Foc4* 后并不影响其致病力。前期曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 中的研究表明,供体质粒 (donor plasmid) 环状质粒 HDR 模板介导的重组效率高于线性 DNA 片段^[24]。本研究在构建基因编辑的 *carS*-HDR 模板时,将 *Foc4carS* 基因上、下游大约 1.2 kb 的同源臂 DNA 片段进行融合 PCR,导入 pUC19 载体后,多次试验仍然无法获取转化子,因此,将该融合片段导入 pYF11 酵母载体,获得 pYF11-*Foc4carS*-HDR 质粒作为供体质粒用于 CRISPR/Cas9 基因编辑。

综上, *Foc4carS* 基因在次生代谢产物类胡萝卜素的生物合成中发挥重要作用,可作为香蕉枯萎菌的内源报告基因。以 *Foc4carS* 为靶标基因建立香蕉枯萎菌 *Foc4* 的质粒型 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,为病原菌的功能基因组学提供有力的技术支撑。

参考文献

- [1] KRISTENSEN R, TORP M, KOSIAK B, HOLST-JENSEN A. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences[J]. Mycological Research, 2005, 109: 173-186.
- [2] KELLER N P, TURNER G, BENNETT J W. Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3: 937-947.
- [3] JIN J M, LEE J, LEE Y W. Characterization of carotenoid biosynthetic genes in the ascomycete *Gibberella zeae*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 302: 197-202.
- [4] RODRÍGUEZ-ORTIZ R, LIMÓN M C, AVALOS J. Functional analysis of the *carS* gene of *Fusarium fujikuroi*[J]. Molecular Genetics and Genomics. 2013, 288: 157-173.
- [5] RUGER-HERREROS M, PARRA-RIVERO O, PARDO-MEDINA J, ROMERO-CAMPERO F J, LIMÓN M C, AVALOS J. Comparative transcriptomic analysis unveils interactions between the regulatory CarS protein and light response in *Fusarium*[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 67.
- [6] RODRÍGUEZ-ORTIZ R, MICHIELSE C, REP M, LIMÓN M C, AVALOS J. Genetic basis of carotenoid overproduction in *Fusarium oxysporum*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2012, 49: 684-696.
- [7] AVALOS J, PARDO-MEDINA J, PARRA-RIVERO O, RUGER-HERREROS M, RODRÍGUEZ-ORTIZ R, HORNERO-MÉNDEZ D, LIMÓN M C. Carotenoid biosynthesis in *Fusarium*[J]. Journal of Fungi (Basel), 2017, 3(3): 39.
- [8] NISAR N, LI L, LU S, KHIN N C, POGSON B J. Carotenoid metabolism in plants[J]. Molecular Plant, 2015, 8(1): 68-82.
- [9] AVALOS J, CERDÁ-OLMEDO E. Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*[J]. Current Genetics, 1987, 25: 1837-1841.
- [10] PARDO-MEDINA J, GUTIÉRREZ G, LIMÓN M C, AVALOS J. The *carP* lncRNA is a *carS*-related regulatory element with broad effects on the *Fusarium fujikuroi* transcriptome[J]. Non-coding RNA, 2021, 7(3): 46.
- [11] PARRA-RIVERO O, PARDO-MEDINA J, GUTIÉRREZ G, LIMÓN M C, AVALOS J. A novel lncRNA as a positive regulator of carotenoid biosynthesis in *Fusarium*[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 678.
- [12] RUGER-HERREROS M, NORDZIEKE S, VEGA-ÁLVAREZ C, AVALOS J, LIMON M C. Relation between CarS expression and activation of carotenogenesis by stress in *Fusarium fujikuroi*[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 1000129.
- [13] 李红花, 刘钢. CRISPR/Cas9 在丝状真菌基因组编辑中的应用[J]. 遗传, 2017, 39(5): 355-367.

- LI H H, LIU G. The application of CRISPR/Cas9 in genome editing of filamentous fungi[J]. *Hereditas*, 2017, 39(5): 355-367. (in Chinese)
- [14] SHI T Q, GAO J, WANG W J, WANG K F, XU G Q, HUANG H, JI X J. CRISPR/Cas9-based genome-editing in the filamentous fungus *Fusarium fujikuroi* and its application in strain engineering for gibberellic acid production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(2): 445-454.
- [15] WANG Q, COBINE P A, COLEMAN J J. Efficient genome editing in *Fusarium oxysporum* based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2018, 117: 21-29.
- [16] 王艳玮, 曾凡云, 漆艳香, 丁兆建, 谢艺贤, 张欣, 彭军. 香蕉枯萎病菌内源报告基因比卡菌素聚酮合酶编码基因 *Bik1* 的鉴定及应用[J]. *热带作物学报*, 2022, 43(3): 473-483. WANG Y W, ZENG F Y, QI Y X, DING Z J, XIE Y X, ZHANG X, PENG J. Identification and feasibility analysis the endogenous reporter gene of bikaverin PKS-encoding gene (*Bik1*) in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2022, 43(3): 473-483. (in Chinese)
- [17] WANG W Q, TANG W H. Generation of *Fusarium graminearum* knockout mutants by the split marker recombination approach[J]. *Bio-Protocol*, 2018, 8(16): e2976.
- [18] YU J H, HAMARI Z, HAN K H, SEO J A, REYES-DOMÍNGUEZ Y, SCAZZOCCHIO C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41: 973-981.
- [19] ANDRIE R M, MARTINEZ J P, CIUFFETTI L M. Development of ToxA and ToxB promoter-driven fluorescent protein expression vectors for use in filamentous ascomycetes[J]. *Mycologia*, 2005, 97(5): 1152-1161.
- [20] MOHAMED A A, MAK C, LIEW K W, HO Y W. Early evaluation of banana plants at nursery stage for *Fusarium* wilt tolerance[C]//MOLINA A B, NIK MASDEK N H, LIEW K W. Seminar on banana *Fusarium* wilt management towards sustainable cultivation, Pahang, Malaysia. Montpellier: international Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, 1999: 174-185.
- [21] MARENTE J, AVALOS J, LIMÓN M C. Controlled transcription of regulator gene *carS* by Tet-on or by a strong promoter confirms its role as a repressor of carotenoid biosynthesis in *Fusarium fujikuroi*[J]. *Microorganisms*, 2020, 9(1): 71.
- [22] 景润春, 卢洪. CRISPR/Cas9 基因组定向编辑技术的发展与在作物遗传育种中的应用[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(7): 1219-1229. JING R C, LU H. The development of CRISPR/Cas9 system and its application in crop genome editing[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(7): 1219-1229. (in Chinese)
- [23] ARAZOE T, MIYOSHI K, YAMATO T, OGAWA T, OHSATO S, ARIE T, KUWATA S. 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.
- [24] KATAYAMA T, NAKAMURA H, ZHANG Y, PASCAL A, FUJII W, MARUYAMA J I. Forced recycling of an AMA1-based genome-editing plasmid allows for efficient multiple gene deletion/integration in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(3): e01896-18.