

甘蔗镰孢菌插入突变体库的构建、致病变异突变体筛选及突变基因定位

蒙姣荣^{1,2}, 黄海娟³, 杨惠贞³, 曾泉³, 李珅雨¹, 陈保善^{1,2*}

1. 广西大学农学院/广西甘蔗生物学重点实验室, 广西南宁 530004; 2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530004; 3. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004

摘要: 由镰孢菌复合种引起的甘蔗梢腐病 (pokkah boeng disease, PBD) 是甘蔗的主要病害之一。在广西, 甘蔗镰孢菌 (*Fusarium sacchari*) 是 PBD 的优势病原菌。尽管 PBD 的研究已有较长的历史, 但甘蔗镰孢菌的致病分子机理远未得到阐明。为研究甘蔗镰孢菌的致病分子机理, 本研究采用农杆菌介导的遗传转化 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 技术构建甘蔗镰孢菌 FF001 菌株的 T-DNA 插入突变体库。采用携带潮霉素 B 磷酸转移酶基因 pTHR1-AH 双元载体的农杆菌菌株 AGL-1 介导转化 *F. sacchari* 分生孢子, 获得 3018 个转化子; 随机选取 12 个转化子进行 PCR 检测和 Southern 杂交分析, 结果显示所有检测突变株均插入潮霉素 B 磷酸转移酶基因, 多数为单拷贝插入。采用离体叶片接种评价转化子的致病力, 获得致病力明显减弱 21 个和致病力增强 9 个, 共 30 个突变体。通过 TAIL-PCR 扩增测序并与甘蔗镰孢菌基因组序列比对, 确定了其中 27 个突变株的 T-DNA 插入位点。观察到多个插入位点伴随有基因组片段缺失, 导致 1 个插入位点可以影响 1 个以上的功能基因。T-DNA 插入位点多为编码区和启动子区, 少数为终止子区和间隔区。受影响的基因分别编码 α -甘露糖苷酶 (α -mannosidase)、中性氨基酸渗透酶 (neutral amino acid permease)、寡聚高尔基复合体成分 4 (oligomeric golgi complex component 4)、寡肽转运蛋白 (oligopeptide transporter)、酰基辅酶 A 脱氢酶 (acyl-CoA dehydrogenase)、乙酰乙酰-CoA 合成酶 (acetoacetyl-CoA synthetase)、碳酸酐酶 (carbonic anhydrase)、Bud 10 蛋白 (Bud 10 protein)、类驱动蛋白 bimC (kinesin-related protein bimC)、锌指蛋白 ASD4 (zinc finger protein ASD4)、转录起始因子 TFIID (transcription initiation factor TFIID)、角质酶 G-box 结合蛋白 (cutinase G-box binding protein)、吡啶黄素敏感性控制蛋白 (acriflavine sensitivity control protein ACR-2)、核类 VCP 蛋白 (nuclear VCP-like protein)、热激蛋白 HSP30 (heat shock protein 30)、硫氧还蛋白 (thioredoxin)、2C 型蛋白磷酸酶 (type 2C protein phosphatase)、核糖核酸外切酶 (exoribonuclease)、硒蛋白 (selenoprotein)、DNA 聚合酶 η (DNA polymerase eta)、存活因子 1 (survival factor 1) 和乙醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase) 等 22 个已知功能蛋白和 16 个未知功能蛋白。部分突变基因, 如锌指蛋白 ASD4、角质酶 G-box 结合蛋白、寡肽转运蛋白和 2C 型蛋白磷酸酶等, 已分别在稻瘟病菌、稻曲病菌、胶孢炭疽菌和尖孢镰孢菌等植物病原真菌中证实为致病相关基因。多种类型致病相关突变体的获得, 为深入研究甘蔗镰孢菌致病分子机理提供了新的材料。

关键词: 甘蔗镰孢菌; 农杆菌介导; 遗传转化; 致病力相关基因; 侧翼序列; 甘蔗梢腐病

中图分类号: S435.661 文献标识码: A

Construction of *Fusarium sacchari* Mutant Library, Screening of Pathogenic Mutants, and Identification of Mutated Genes

MENG Jiaorong^{1,2}, HUANG Haijuan³, YANG Huizhen³, ZENG Quan³, LI Shenyu¹, CHEN Baoshan^{1,2*}

1. College of Agriculture, Guangxi University / Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Biology, Nanning, Guangxi 530004, China; 2.

收稿日期 2022-05-10; 修回日期 2022-06-15

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31960031); 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD17129002); 广西甘蔗重点实验室自主课题项目 (No. 2018-266-Z01)。

作者简介 蒙姣荣 (1971—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 植物病理学。*通信作者 (Corresponding author): 陈保善 (CHEN Baoshan), E-mail: chenyaobj@gxu.edu.cn。

State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning, Guangxi 530004, China; 3. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China

Abstract: Pokkah boeng disease (PBD) caused by *Fusarium* complex is one of the major diseases in sugarcane with great impact on the sugarcane industry worldwide. *F. sacchari* is the prevalent species responsible for PBD in Guangxi. Albeit of a long history of study on the disease, the mechanisms underlying the pathogenicity of the pathogen are still far from clear. To tackle this challenge, we generated an insertional mutant library by transformation of the conidial spores from *F. sacchari* strain FF001 via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT). A total of 3018 hygromycin B-resistant transformants were obtained. Among 12 transformants randomly selected, nine out of 12 transformants carried a single copy of T-DNA, as verified by PCR and Southern blot analysis. The mutants were further screened for virulence variation on detached leaves and 30 mutants with obvious changes in virulence were obtained, including 21 mutants with significantly attenuated and 9 mutants with enhanced virulence. The sites of insertion were determined by thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR) and sequence alignment to the genome sequence of *F. sacchari*. The majority of the insertions were found in coding regions or promoter regions, with a few in terminator or intergenic regions. It was observed that a few insertions were accompanied with genome fragment deletion, resulting in more than one genes being disrupted in a single insertion. Among the 22 mutated genes with annotated functions were those encoding alpha-mannosidase, neutral amino acid permease, oligomeric Golgi complex component 4, oligopeptide transporter 2, acyl-CoA dehydrogenase, acetoacetyl-CoA synthetase, carbonic anhydrase, Bud 10 protein, kinesin-related protein bimC, zinc finger protein ASD 4, transcription initiation factor TFIID, cutinase G-box binding protein, acriflavine sensitivity control protein ACR-2, nuclear VCP-like protein, heat shock protein 30, thioredoxin, type 2C protein phosphatase (PP2C), exoribonuclease, selenoprotein, DNA polymerase eta, survival factor 1, and aldehyde dehydrogenase, several of which, such as zinc finger protein ASD4 in *Magnaporthe oryzae*, cutinase G-box binding protein in *Ustilagoidea virens*, oligopeptide transporter in *Colletotrichum gloeosporioides*, PP2C in *Fusarium oxysporum*, have been implicated as pathogenicity genes. The availability of the diversified pathogenic mutants lay a new foundation for further study on the molecular pathogenic mechanisms of *F. sacchari*.

Keywords: *Fusarium sacchari*; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated; transformation; pathogenicity related genes; flanking sequence; pokkah boeng disease

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.02.002

甘蔗梢腐病 (pokkah boeng disease, PBD) 是甘蔗重要的真菌性病害之一, 在我国主要甘蔗产区普遍发生, 且有逐年上升的趋势^[1]。通常年份甘蔗梢腐病可使甘蔗减产 5%~20%, 发病严重的年份可减产 30.2%~48.5%, 糖分降低 2.63%~5.21%, 造成甘蔗产量及糖分巨大损失^[1-2]。有效防治甘蔗梢腐病已成为目前确保甘蔗糖产业稳定发展急需解决的主要问题之一。

甘蔗镰孢菌 (*Fusarium sacchari*) 最早从甘蔗上分离出来, 其有性阶段为甘蔗赤霉菌 (*Gibberella sacchari*), 是甘蔗梢腐病优势病原菌^[3-6]; 此外, 甘蔗镰孢菌还是甘蔗枯萎病 (sugarcane wilt) 的病原菌, 该病害对甘蔗产量及其糖含量的影响比甘蔗梢腐病的更为严重, 是一种毁灭性病害^[7-8]。在我国, 有从小麦赤霉病样品上分离到甘蔗镰孢菌的报道^[9], 在香蕉果实和叶片上也经常分离到甘蔗镰孢菌^[10-11]。目前, 针对甘蔗镰孢菌的致病分子机理研究十分有限, 已有的文献涉及铁红素合成酶基因功能鉴定、产生毒素种类鉴定和携带

真菌病毒种类鉴定等^[5, 12-13]。最近的文献报道, 在甘蔗镰孢菌与甘蔗互作的研究中鉴定获得一批甘蔗镰孢菌的效应蛋白^[14-16]。

农杆菌介导的遗传转化 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 是获得随机插入突变体的主要遗传手段之一, 其转化起始材料通常不需经过去除细胞壁, 如分生孢子、菌丝体均可用于转化, 操作简便; 同时具有转化率高及多为单拷贝插入等优点, 被广泛应用于真菌功能基因的研究^[17-19], 在包括镰孢菌在内的多种植物病原菌致病基因功能及其致病机制的研究中已有较多成功应用的报道^[20-22]。王鑫等^[23]采用 ATMT 技术构建了的甘蔗梢腐病菌 CNO-1 菌株的突变体库, 并针对生长速度减慢突变体的插入位点序列进行分析。本课题组于 2016—2018 年对广西甘蔗梢腐病发生情况进行全面调查, 并对其病原菌进行鉴定, 明确甘蔗镰孢菌是广西甘蔗梢腐病菌的优势病原菌种类^[6], 并对分离获得的强致病力代表性菌株 FF001 进行了全基因组序列测定

(尚未发表)。本研究采用 ATMT 技术构建菌株 FF001 的突变体库, 筛选致病力差异较大的突变体, 并对突变基因进行定位分析, 以期为克隆致病相关基因提供研究材料, 为甘蔗镰孢菌的致病分子机理研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌种、质粒与甘蔗品种 甘蔗镰孢菌 FF001 菌株为本课题组从具有典型梢腐病症状的甘蔗病株上分离纯化并保存^[6]; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Trans1-T1 感受态和 pEASY-T1 Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司; 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 AGL-1, 携带潮霉素 B 磷酸转移酶基因的 pTHR1-AH 质粒由本实验构建并保存。甘蔗品种 ‘中蔗 9 号’ 为甘蔗梢腐病感病品种, 用于致病力测定。

1.1.2 主要试剂 抗生素利福平 (rifampicin, Rif)、氨苄青霉素 (ampicillin, Amp)、壮观霉素 (spectinomycin, Spe)、头孢霉素 (cefalosporiner, Cef)、潮霉素 B (hygromycin B, Hyg B)、乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) 和 2-(N-马啉)乙基磺酸[2-(N-morpholino) ethane-sulfonic acid, MES] 均购自北京索莱宝科技有限公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, 质粒小量提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; DIG Wash and Block Buffer Set 试剂盒和 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒购自罗氏公司。2×Es Taq Master Mix 购自北京全式金生物技术有限公司, 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 购自美国 BD 公司 (Becton, Dickinson and Company), 其他试剂均为国产分析纯。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.3 培养基 PDA: 按照 BD 公司说明书配制。LB (luria-bertani medium) 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, NaCl 10.0 g, 用纯水定容至 1000 mL, pH 7.0~7.2; 基础培养基 (minimal medium, MM): 无水葡萄糖 2.0 g, KH₂PO₄ 2.05 g, KH₂PO₄ 1.45 g, NH₄NO₃ 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.6 g, NaCl 0.3 g, CaCl₂ 0.01 g, FeSO₄ 0.001 g, Z-Salts 溶液 (1000 mL Z-Salts 含

ZnSO₄·7H₂O、CuSO₄·5H₂O、H₃BO₄、MnSO₄·H₂O 及 NaMoO₄·H₂O 各 0.1 g) 5.0 mL, 用纯水定容至 1000 mL, pH 6.7~7.0; 诱导培养基 (induced medium, IM): MES 7.808 g, 无水葡萄糖 2.0 g, K₂HPO₄ 2.05 g, KH₂PO₄ 1.45 g, NH₄NO₃ 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.6 g, NaCl 0.3 g, CaCl₂ 0.01 g, FeSO₄ 0.001 g, Z-Salts 溶液 5.0 mL, 用纯水定容至 1000 mL, pH 5.6。上述培养基加入 15.0~18.0 g 的琼脂粉, 即为固体培养基。

1.2 方 法

1.2.1 根癌农杆菌介导的甘蔗镰孢菌遗传转化 参照文献[23]的方法进行遗传转化, 并稍作修改。具体步骤: 将携带 pTHR1-AH 质粒的农杆菌 AGL-1 菌株在 LBA 培养基 (Rif、Amp 和 Spec 终浓度均为 50 μg/mL) 上划线, 28℃ 培养 2 d 后挑取单菌落接种到 MM 液体培养基中 (Rif、Amp 和 Spec 终浓度均为 50 μg/mL), 28℃ 条件下振荡培养 (200 r/min) 2 d, 4500 r/min 室温离心 5 min, 用 1 mL IM 培养基重悬菌体, 并稀释至浓度 OD₆₀₀ 为 0.1, 加入 AS (终浓度为 200 μmol/L), 28℃, 振荡培养 48 h (200 r/min); 配制浓度为 1×10⁴ 个/mL 的新鲜甘蔗镰孢菌分生孢子悬浮液, 与上述步骤获得的农杆菌菌液按 1:1 比例混合, 涂布于 IM 固体培养基表面的 0.45 μm 孔径微孔滤膜上, 25℃ 条件下共培养 2 d; 将微孔滤膜转移至筛选 PDA 培养基上 (含 400 μg/mL Cef 和 50 μg/mL Hyg B), 并在微孔滤膜上加一层筛选 PDA 培养基 (含 400 μg/mL Cef 和 100 μg/mL Hyg B), 25℃ 培养 2~3 d 即有可见转化子长出, 将转化子转移到新的筛选 PDA 培养基上 (Cef 400 μg/mL, Hyg B 100 μg/mL), 25℃ 培养 2~3 d, 再次转移到另一新的筛选 PDA 培养基上 (含 Cef 400 μg/mL, Hyg B 50 μg/mL), 25℃ 培养 4~5 d。经过 3 次筛选可在含 50 μg/mL Hyg B PDA 培养基上正常生长的转化子即认定为稳定遗传转化子, 即可保存备用。

1.2.2 突变株总 DNA 的提取及分子鉴定 用 CTAB 法提取野生型菌株和突变株的基因组 DNA。突变株的 PCR 鉴定: 以野生型菌株 FF001 和突变株的基因组 DNA 作为模板, 使用特异性引物 AMP F/HPH-1 R (表 1) 进行 PCR 扩增, 反应体系总体积 25 μL: 2×Ex Taq Master Mix 12.5 μL; 10.0 μmol/L 引物 AMP F 1.0 μL; 10.0 μmol/L 引物 HPH-1 R 1.0 μL; DNA 模板 (20~50 ng/μL)

1.0 μL , ddH₂O 9.5 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 运行 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。Southern 杂交分析: 大量提取野生型菌株和突变的基因组 DNA (50 μg), 分别用快速限制性内切酶 *Xba* I 进行单酶切, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下反应过夜, 酶切产物经氯仿抽提 2 次后取上清加入 2 倍体积的无水乙醇和 3 mol/L 醋酸钠溶液, 充分混匀, -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱放置 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液; 再加入 500 μL 75% 的乙醇溶液洗涤沉淀 2 次, 自然晾干, 加入 35 μL ddH₂O 溶解, 取 25 μL 进行琼脂糖凝胶电泳并转膜。以质粒 pTHR1-AH 为模板, 用引物 AMP F/HPH-1 R 进行扩增获得的 DNA 片段作为探针, 参照罗氏公司地高辛试剂盒说明书进行标记, 杂交。按照 DIG Wash and Block Buffer Set 试剂盒说明书进行洗膜等。用 LAS500 超灵敏化学发光成像仪成像分析杂交结果。

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequences (5'-3')
AMP F	CTGGATGGAGGCGGATAAAGTT
HPH-1 R	CGCCCTCTACATCGAAGCT
RSP2	TTTACCCTACAAGTTGGCGCTGACC
RSP3	TTCGGTATGTCCGCGGTATGTCAGC
RSP4	AGAGGATCCCCCTGCTGGGATTAC
M13-47	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
LSP3	GCTTCCTAACTGCAAGCGCAATGG
LSP2	CCAACCTCCGAAGTGGAGCTCG
AD5	GTNCGASWCANAWGTT

Note: S=C/G; W=A/T; N=A/G/T/C.

1.2.3 突变体致病力的测定 参照 WANG 等^[24] 接种叶片的方法进行突变株的致病力测定。突变体及野生型菌株分别接种于 PDA 平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4~5 d, 在菌落边缘取直径 0.6 cm 的菌丝圆片; 选取生长 4~8 个月, 健康甘蔗植株 ('中蔗 9 号') 完全展开的+1 或+2 位叶片, 弃其基部约 10 cm, 依次剪取约 6 cm 叶片 (一张叶片约 8 个叶片节段), 从叶片边缘垂直中脉方向剪一切口 (切口大约为 1.0 cm), 将菌丝圆片覆盖在切口上, 保湿, 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 3~4 d, 记录病斑出现时间, 测量病斑直径, 每个突变株接种 3 张叶片。经过 3 次致病力测定获得遗传稳定的致病变异突变株; 第

一次初筛使用突变库所有突变株进行致病力测定, 第二次复筛使用第一次初筛致病力有明显变化 (增强或减弱) 的突变株, 第二次复筛获得的致病力有明显变化的突变株经过单孢分离后进行第三次致病力测定, 当 1 个突变株的 3 个以上的单孢分离株均表现为致病力有明显变化且表现一致时 (即所有单孢分离株致病力全部变弱或全部增强) 确定为致病变异突变株, 并用于插入位点序列扩增与基因定位分析。

1.2.4 致病变异突变体 T-DNA 插入位点侧翼序列的扩增与突变基因定位 使用 AD5 随机引物和右边界 (right border, RB) 及左边界 (left border, LB) 序列的特异引物, 参照文献^[25-26] 采用热不对称交错 PCR (thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR) 方法对突变体的 T-DNA 侧翼序列进行扩增。第一轮反应以突变株总 DNA 作为模板, 简并引物 AD5 与特异引物 RSP4 (RB 侧翼序列) 或 M13-47 (LB 侧翼序列) 为引物; 以第一轮反应的 PCR 产物 (稀释 50 倍) 作为模板进行第二轮反应, 引物为 AD5 与 RSP3 或 LSP3; 以第二轮反应的 PCR 产物 (稀释 50 倍) 作为模板进行第三轮反应, 引物为 AD5 与 RSP2 或 LSP2。TAIL PCR 结束后取 5.0 μL 第二轮和第三轮 PCR 的扩增产物, 在 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分析, 使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对第二轮或第三轮 PCR 产物进行纯化回收, 与 pEASY-T1 载体连接并转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态, 质粒小量提取试剂盒提取阳性克隆并测序。利用 SNAP.GENE 软件上查找所获得序列的特异引物 (RSP3 或 RSP2、LSP3 或 LSP2) 及 T-DNA 的 RB 和 LB 侧翼序列, 并与甘蔗镰孢菌 FF001 的基因组序列 (尚未发表数据) 比对, 结合 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 比对结果, 确定插入位点基因及其功能。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导的甘蔗镰孢菌的遗传转化

使用携带潮霉素抗性基因 pTHR1-AH 质粒的农杆菌 AGL-1 菌株介导转化甘蔗镰孢菌分生孢子, 在含 Hyg B 的筛选 PDA 培养基依次进行 3 次筛选 (前 2 次 Hyg B 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 第三次为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 获得 3018 个稳定遗传的 Hyg B 抗性转化子, 依次命名 FsAT0001~FsAT3018。随机提取 50 个转化子接种于不含 Hyg B 的 PDA 上,

28℃条件下培养 7 d 后进行培养性状观察。结果显示, 大部分转化子在 PDA 上的生长速率和菌落形态与野生型菌株 FF001 的未有明显区别,

少数转化子表型与野生型相比表现很大的差异, 表现为生长速率减慢、生长衰减和产生色素等 (图 1)。

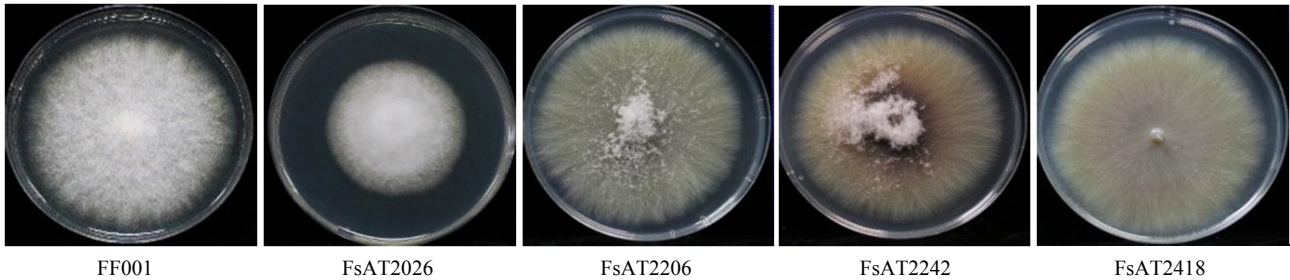


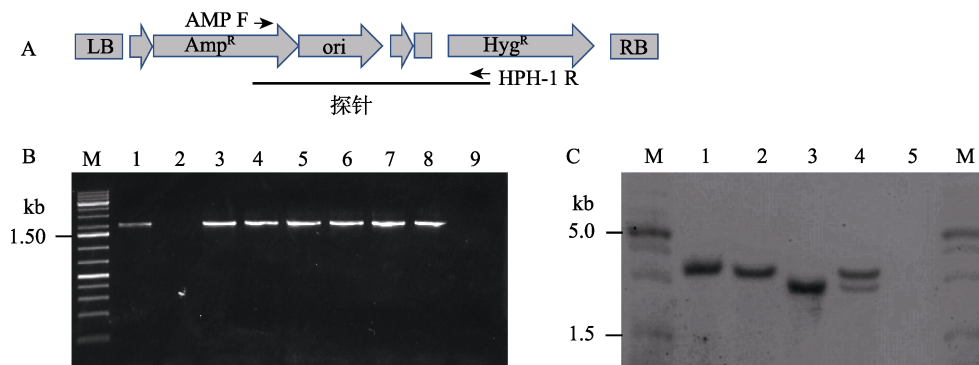
图 1 野生型菌株 FF001 和 4 个表型明显变化转化子的培养性状

Fig. 1 Colonial morphology of wild type strain FF001 and four transformants with significant changes in phenotypes

2.2 转化子分子鉴定

为确定获得的转化子是否携带潮霉素抗性基因及其插入拷贝数, 依据 pTHR1-AH 双元表达载体的序列 (图 2A) 设计引物 AMP F/HPH-1 R, 随机挑选 12 个转化子提取总 DNA 进行 PCR 检测。结果显示, 所有检测转化子和 pTHR1-AH 阳性对照均能扩增出约 1900 bp 特异性目标条带, 而野生型菌株 FF001 没有扩增任何可见条带 (图

2B); 同样地, 以 AMP F/HPH-1 R 为引物, 扩增 pTHR1-AH 获得的 DNA 作为探针进行 Southern 杂交, 测试的 4 个转化子均出现杂交条带, 野生型菌株 FF001 没有杂交条带 (图 2C), 说明 T-DNA 片段已经整合在 FF001 菌株基因组上。统计 12 个转化子的 Southern 杂交结果, 有 9 个突变株的 T-DNA 为单拷贝插入, 3 个突变株为双拷贝插入, 未观察到 3 个及以上拷贝插入。



A: PCR 引物和 Southern 杂交探针位置示意图。B: 突变株的 PCR 检测电泳图, 引物为 AMP F/HPH-1 R; 1: pTHR1-AH; 2: 野生型菌株 FF001; 3~8: 突变体; 9: 对照 (水)。C: 突变株的 Southern 杂交分析, 1~4: 突变体; 5: 野生型菌株 FF001。M: 1 kb Plus DNA ladder。

A: Scheme of genomic DNA of *F. sacchari* disrupted by T-DNA integration, AMP F/HPH-1 R primers and probe used for hybridization are indicated. B: PCR detection of the transformants with the AMP F and HPH-1 R primers, 1: pTHR1-AH; 2: Wild-type FF001; 3~8: Independent transformants; 9: Water. C: Southern blot analysis of wild type *Fs* FF001 and four transformants, 1~4: mutant; 5: Wild-type FF001. M: 1 kb Plus DNA ladder.

图 2 部分转化子的潮霉素磷酸转移酶基因的 PCR 检测及 Southern 杂交分析

Fig. 2 PCR detection of *hph* gene and southern Southern blot analysis of transformants

2.3 致病变异突变体的筛选

为获得甘蔗镰孢菌致病相关基因, 采用叶片离体接种法进行 3 次筛选, 测定了所有 3018 个转化子的致病力。接种野生型菌株 FF001 3~4 d 后, 甘蔗叶片表现出黄色的坏死斑, 病斑长度在 2.0~3.0 cm 之间; 有 21 个突变株表现为致病力下降 (如

图 3 中 FsAT1336、FsAT2953 和 FsAT3001 菌株), 接种 3~4 d 后, 病斑长度在 1.0~2.5 cm 之间; 此外, 有 9 个突变株表现为致病力增强 (如图 3 的 FsAT0444 和 FsAT1899 菌株), 接种 3 d 后即可产生明显的病斑, 病斑长度超过 3.5 cm; 其余的大部分转化子致病力未有明显变化 (图 3 的 FsAT0126

菌株), 病斑产生的时间其大小与野生型菌株相比无明显差异 (图 3)。

2.4 致病变异突变体插入位点侧翼序列扩增

为明确致病变异突变体 T-DNA 插入位点的侧翼序列, 提取所有 30 个致病变异突变体总 DNA, 采用 TAIL-PCR 的方法分别插入位点的侧翼序列进行 3 轮 PCR 扩增。分别取第二轮或第三轮 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示,

共有 27 个突变株在第二轮或者第三轮 PCR 后获得清晰的特异条带, 其中有 12 个突变体的左右边界侧翼序列均能有效扩增, 其余突变株只能单一的侧翼序列; 3 个突变株 (FsAT0007、FsAT0017 和 FsAT1019) 未能有效扩增出侧翼序列片段; 部分突变株第三轮 TAIL-PCR 后仍有 2~3 条清晰条带。图 4 为部分突变株第二轮或第三轮反应后的 PCR 产物的电泳凝胶图。

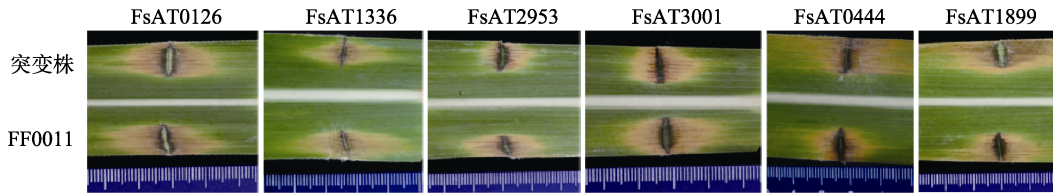
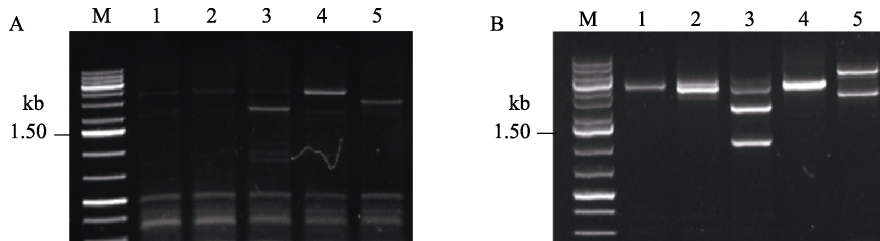


图 3 野生型菌株 FF001 和部分转化子的致病力

Fig. 3 Pathogenicity of wild type strain FF001 and partial transformants



A: 第二轮反应 PCR 产物; B: 第三轮反应 PCR 产物; M: 1 kb Plus DNA ladder; 1~5: 突变体。

A: Products from the secondary reactions; B: Products from the tertiary reactions; M: 1 kb Plus DNA ladder; 1-5: mutant.

图 4 5 个突变株的 TAIL-PCR 产物的电泳凝胶图

Fig. 4 Agarose gel analysis of TAIL-PCR products of five mutants

2.5 致病变异突变体插入位点 T-DNA 边界序列特点

将 TAIL-PCR 产物回收纯化后测序, 对扩增出 2 条及以上条带的转化子, 剔除片段较短或 T-DNA 边界序列不完整的序列, 最终获得 39 条有效序列, 其中 RB 侧翼序列 24 条, LB 侧翼序列 15 条。为确定 T-DNA 整合到甘蔗镰孢菌基因

组中的方式, 将侧翼序列分别与载体 pTHPR1-AH 的 T-DNA 序列比对, 发现在 24 条 RB 侧翼序列中, RB 边界序列完整的有 20 条, 占比 83.3% (未显示)。相反, 在 15 条 LB 侧翼序列中, LB 边界序列完整的仅有 5 个, 占比 33.3%, 其余序列的 LB 边界均有不同程度的截短, 其中 FsAT0372 突变株 LB 边界序列缺失片段最长, 为 64 bp (图 5)。

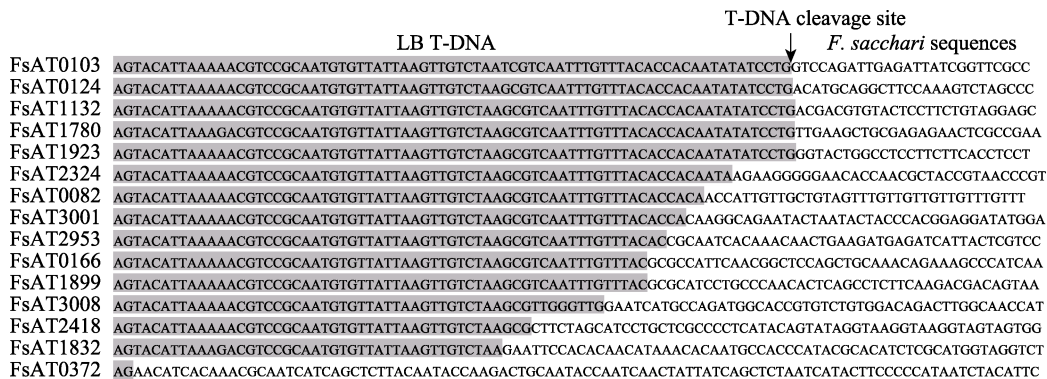


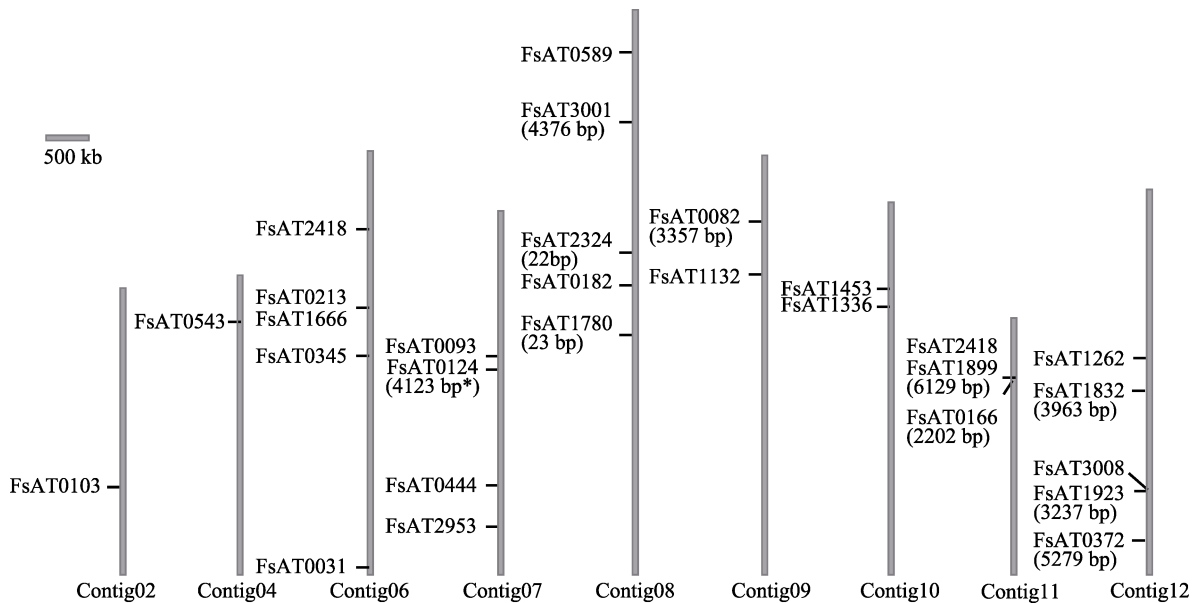
图 5 致病突变体 T-DNA 插入位点左边界序列分析

Fig. 5 Alignment of the left border (LB) sequences at the junction of T-DNA integration site of *F. sacchari*

2.6 致病变异突变体突变基因的定位及其功能

将侧翼序列与甘蔗镰孢菌 FF001 菌株基因组序列进行比对, 结合 NCBI 比对结果, 获得突变及其对应基因的功能注释。与 FF001 基因组序列进行比对结果显示, FsAT2418 突变株 RB 和 LB 侧翼序列分别与 2 条不同 contig (contig00006 和 contig00011) 上的序列对应, 其余突变株的侧翼序列均对应于 FF001 基因组的单一序列, 分布在 9 条 contig 上; 对同时获得 RB 和 LB 侧翼序列的

12 个突变体的插入位点进一步分析, 发现在突变体 FsAT3008 中, T-DNA 插入为直接插入; 在 FsAT1780 和 FsAT2324 中, T-DNA 插入造成 22~23 bp 的小片段基因组缺失, 而其余突变株中, T-DNA 插入均可造成基因组较大片段的缺失, 其大小在 2202~6129 bp 之间。此外, 突变株 FsAT0213 和 FsAT1666 的 RB 插入位点相同, FsAT1899 和 FsAT2418 RB、FsAT0166 RB 和 FsAT1899 LB 分别插入同一基因的不同位点 (图 6)。



*括号中的数字表示基因组 DNA 缺失片段的大小。

The numbers in parentheses indicate the size of genomic DNA deletion fragments.

图 6 突变株的 T-DNA 插入位点在甘蔗镰孢菌基因组 contig 上的位置示意图

Fig. 6 Distribution of T-DNA in the contigs of *F. sacchari* genome

将获得的 39 条单一侧翼序列, 在 NCBI 上进行同源序列搜索, 并进行插入位点分析, 结果显示有 19 个 T-DNA 插入位点位于相应基因的编码区, 16 个 T-DNA 插入位点位于相应基因的启动子区域, 2 个 T-DNA 插入位点位于终止子区, 另有 2 个 T-DNA 插入位点位于基因间隔区 (表 2)。甘蔗镰孢菌基因功能注释结果显示, 插入位点的基因分别编码 22 个已知功能蛋白和 16 个未知功能蛋白, 其中致病力减弱突变体的插入位点基因编码的蛋白功能可以分成 6 类, 第一类为参与物质转运与代谢相关的蛋白 (7 个), 包括 α -甘露糖苷酶 (*alpha-mannosidase*)、中性氨基酸渗透酶 (*neutral amino acid permease*)、寡聚高尔基复合体成分 4 (*oligomeric golgi complex component 4*)、寡肽转运蛋白 (*oligopeptide transporter, OPT*)、酰基辅酶 A 脱氢酶 (*acyl-CoA dehydrogenase*)、乙

酰乙酰-CoA 合成酶 (*acetoacetyl-CoA synthetase*) 和类驱动蛋白 *bimC* (*kinesin-related protein bimC*); 第二类为转录因子 (4 个), 包括锌指蛋白 ASD4 (*zinc finger protein ASD4*)、转录起始因子 TFIID (*transcription initiation factor TFIID*)、角质酶 G-box 结合蛋白 (*cutinase G-box binding protein, CGBP*)、吡啶黄素敏感性控制蛋白 (*acriflavine sensitivity control protein ACR-2*); 第三类为分子伴侣 (2 个), NVL 蛋白 (*nuclear VCP-like protein*) 和热激蛋白 HSP30 (*heat shock protein 30*); 第四类为参与 RNA 降解的核糖核酸外切酶 (*exoribonuclease*), 第五类为参与 DNA 损伤修复的 DNA 聚合酶 η (*DNA polymerase eta*), 第六类为未知功能蛋白 (10 个) (表 2); 此外, FsAT0082 缺失片段包含的基因编码存活因子 1 (*survival factor 1, SVF1*), FsAT1832 缺失片段包

表 2 致病变异突变体 T-DNA 插入位点侧翼序列
Tab. 2 Sequence analysis of T-DNA flanking regions of *F. sacchari* mutants

突变株 Mutant	致病力 Pathogenicity	边界 Border	基因编号 Gene ID	比对结果 Blast hit	插入位点 Insertion site
FsAT0031	attenuated	RB	EVM0009260	Uncharacterized protein	Promotor region
FsAT0082	attenuated	RB	EVM0008635	Zinc finger protein ASD4	Promotor region
		LB	EVM0005760	Uncharacterized protein	Coding region
FsAT0093	attenuated	RB	EVM0004458	Alpha-mannosidase	Promotor region
FsAT0103	attenuated	LB	EVM0005331	Neutral amino acid permease	Coding region
FsAT0124	attenuated	RB	PB.4861	Transcription initiation factor TFIID	Promotor region
		LB	Intergenic region	Intergenic region	Intergenic region
FsAT0166	attenuated	RB	EVM0004322	Uncharacterized protein	Coding region
		LB	EVM0005807	Uncharacterized protein	Coding region
FsAT0182	attenuated	RB	EVM0002940	Uncharacterized protein	Promotor region
FsAT0213	attenuated	RB	EVM0013508	Oligomeric golgi complex component 4	Coding region
FsAT0345	attenuated	RB	EVM0006752	Cutinase G-box binding protein	Coding region
FsAT0372	attenuated	RB	EVM0009246	Oligopeptide transporter	Coding region
		LB	EVM0014118	uncharacterized protein	Promotor region
FsAT0543	attenuated	RB	EVM0013351	Nuclear VCP-like protein	Promotor region
FsAT0589	attenuated	RB	EVM0011958	Uncharacterized protein	Promotor region
FsAT1132	attenuated	LB	EVM0003952	Acyl-CoA dehydrogenase	Coding region
FsAT1262	attenuated	RB	Intergenic region	Intergenic region	Intergenic region
FsAT1336	attenuated	RB	EVM0001734	Acriflavine sensitivity control protein ACR-2	Promotor region
FsAT1453	attenuated	RB	EVM0001057	Acetoacetyl-CoA synthetase	Promotor region
FsAT1666	attenuated	RB	EVM0013508	Oligomeric golgi complex component 4	Coding region
FsAT1780	attenuated	RB	EVM0010943	Heat shock protein 30	Coding region
		LB	EVM0010943	Heat shock protein 30	Coding region
FsAT1832	attenuated	RB	EVM0008431	Exoribonuclease	Coding region
		LB	EVM0004124	Uncharacterized protein	Terminator region
FsAT2953	attenuated	LB	PB.4343	DNA polymerase eta	Coding region
FsAT3001	attenuated	RB	EVM0012262	Uncharacterized protein	Promotor region
		LB	EVM0012371	Kinesin-related protein bimC	Coding region
FsAT3008	attenuated	RB	EVM0008581	Uncharacterized protein	Promotor region
		LB	EVM0008581	Uncharacterized protein	Promotor region
FsAT0444	enhanced	RB	EVM0009607	Uncharacterized protein	Coding region
FsAT1899	enhanced	RB	EVM0014180	Carbonic anhydrase	Promotor region
		LB	EVM0004322	Uncharacterized protein	Coding region
FsAT1923	enhanced	RB	EVM0013270	Bud10 protein	Terminator region
		LB	EVM0006069	Type 2C protein phosphatase	Coding region
FsAT2324	enhanced	RB	EVM0010029	Thioredoxin	Coding region
		LB	EVM0010029	Thioredoxin	Coding region
FsAT2418	enhanced	LB	EVM0011042	Selenoprotein domain protein	Promotor region
		RB	EVM0014180	Carbonic anhydrase	Promotor region

含的基因编码乙醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase, ALDH), 其余突变株 (FsAT0124、FsAT0166、FsAT0372 和 FsAT3001) 缺失片段分别编码 4 个未知功能蛋白基因。致病力增强突变

株的插入位点基因则分别编码碳酐酸酶 (carbonic anhydrase)、Bud 10 蛋白 (Bud 10 protein)、硫氧还蛋白 (thioredoxin)、硒蛋白 (selenoprotein)、2C 型蛋白磷酸酶 (type 2C protein phosphatase,

PP2C) 和 2 个未知功能蛋白。T-DNA 插入基因的编码区或者引起基因的缺失, 可以直接破坏基因的功能, 而插入位点为基因启动子区和终止子区的突变体有可能是通过影响目标基因的表达从而影响突变体的致病力。

3 讨论

甘蔗镰孢菌是广西甘蔗梢腐病的优势病原菌^[6], 其致病分子机理研究鲜有报道。本研究以强致病力菌株 FF001 为出发菌株, 采用 ATMT 技术构建了库容量为 3018 个突变株的突变体库, 筛选获得 30 个致病变异突变体, 并对插入位点基因进行的定位与分析, 获得一批可能的致病相关基因, 为甘蔗镰孢菌致病基因功能研究, 阐明其致病分子机理提供了直接、可靠的试验材料。

在构建突变体过程中, 曾尝试完全参照王鑫等^[23]描述的方法构建突变体库, 甘蔗镰孢菌分生孢子与农杆菌共培养后将微孔滤膜转移到筛选 PDA 培养基培养 2 d, 直接挑取转化子, 转化多批次均未能获得真正的转化子。随后改为在微孔滤膜上加盖一层含 Hyg B (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 PDA 筛选培养基, 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 2 d 即有可见单个转化子长出, 经过 3 次 Hyg B 抗性筛选获得遗传稳定的转化子。随机挑选转化子进行 PCR 检测和 Southern 杂交, 结果显示全部为阳性转化子, 说明改进后所获得的文库质量较好。

TAIL-PCR 技术是扩增插入序列 T-DNA 未知侧翼序列的常用方法^[26-27]。本研究采用 TAIL-PCR 对 30 个突变株插入位点侧翼序列进行扩增, 获得 24 个 RB 侧翼序列和 15 个 LB 侧翼序列, 绝大多数 RB 侧翼序列保留完整的右边界序列; 相反, 在 15 个 LB 侧翼序列中, 只有 5 个的 T-DNA 左边界被完整保留下来, 其余的均存在不同程度的截短, 研究结果与其他真菌的 ATMT 转化结果^[28-29]相似。姚姿婷^[25]使用特异引物与简并引物 AD5 对板栗疫病病菌突变体的 RB 和 LB 侧翼序列进行 TAIL-PCR 扩增, 均有较好的扩增效果; 本研究使用 AD5 与特异引物对所有突变体进行 TAIL-PCR 扩增, 获得 24 条 RB 侧翼序列, 成功率 80.0%, 说明 AD5 同样适用于扩增甘蔗镰孢菌突变体的侧翼序列。

转录因子在植物病原真菌的生长发育和致病过程中发挥重要作用^[30]。稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 锌指蛋白 ADS4 属于 GATA 型转录因子,

ADS4 基因的缺失导致突变体孢子萌发后不能膨大形成附着胞^[31]。稻曲病菌 (*Ustilagoidea virens*) 角质酶 G-box 位点结合蛋白 UvCGBP1 则属于 C₂H₂ 型转录因子, 通过介导 MAPK 途径相关基因的表达调控其致病力^[32]。生存因子 SVF1 最早在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中被鉴定, 与人类抗凋亡基因 Bcl-XL 存在一定功能互补, 是酿酒酵母在氧化应激下生存所必需^[33]。在禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 中 SVF1 同源基因 *FgSVF1* 缺失会导致其致病力完全丧失^[34], 将核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) *SsSVF1* 基因沉默也降低其致病力^[35]。氨基酸渗透酶也称氨基酸转运蛋白 (amino acid transporter), 主要参与生物体的氨基酸进行吸收和转运, 直接调节细胞内氨基酸种类和浓度, 在细胞生长发育中起到重要调节作用^[36]。有多种氨基酸渗透酶在新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 致病过程起到重要作用^[37]; 在稻瘟病菌中, 单缺失 3 个普通氨基酸渗透酶 *MoGAP1~MoGAP3* 基因的突变株表现为生长速度减小、致病力下降^[38-39]。寡肽转运蛋白广泛存在于真菌、植物和细菌中, 主要转运 3~6 肽或更长的寡肽。已有研究表明, CgOPT1 和 CgOPT2 参与胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 的生长发育和致病过程^[40-41]。乙醛是多种基本代谢途径的中间体, 其过高的生理浓度会对细胞生长、存活和膜完整性产生负面影响。乙醛脱氢酶是一类进化上保守的依赖酶 NADP⁺ 多态性酶, 可将乙醛不可逆氧化为乙酸, 直接调节细胞内乙醛的浓度。在稻瘟菌中, 通过 RNAi (RNA interference) 方法沉默 3 个乙醛脱氢酶编码基因, 其突变株的产孢量、抗逆性和致病力均明显降低^[42]。本研究部分致病力减弱突变株插入位点基因或缺失基因分别编码乙醛脱氢酶、锌指蛋白 ASD4、角质酶 G-BOX 结合蛋白、寡肽转运蛋白、存活因子 1 和氨基酸渗透酶等, 推测可能是 T-DNA 插入导致上述基因功能缺失或表达量降低。PP2C 是一个多成员蛋白家族, 具有独特的 N 端延伸, 以单体酶形式存在, 广泛存在于动物、植物、细菌及真菌中, 参与调控生物体内的多个生命活动过程^[43]。在灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 和尖孢镰孢菌中, PP2C 基因的缺失均可导致致病力减弱^[43-44]。不同的 PP2C 调控作用有一定的差异。如在酵母中的 PTC1 负向调控 HOG (high-osmolarity glycerol) 信号途径, 而其同源

基因在灰葡萄孢菌中起到正向调控作用^[43]。本研究突变株 FsAT1923 T-DNA 的插入造成 1 个 *PP2C* 基因的大片段缺失, 其致病力增强, 推测该基因在甘蔗镰孢菌的致病过程起到负向调控作用, 使得基因缺失后其致病力增强。其他突变株的插入位点基因, 如编码甘露糖苷酶、吡啶黄素敏感性控制蛋白和核类 VCP 蛋白等基因在植物病原菌致病过程中的作用研究尚无报道, 而编码未知功能蛋白的基因可能是甘蔗镰孢菌新的或特异的致病相关基因, 今后将通过基因敲除、功能回补等遗传学试验对上述基因的功能进一步验证与分析。本课题组已经构建了编码碳酞酸酶和寡肽转运蛋白基因的缺失突变株, 用菌饼进行离体接种, 前者表现为致病力增强, 后者表现为致病力减弱 (数据另文发表), 与 T-DNA 插入突变株表现结果一致, 说明本研究经过 3 轮的致病力测定, 获得的致病突变株遗传稳定, 为甘蔗梢腐病的致病相关基因功能研究提供了切实可行的研究材料。

本研究获得的致病变异突变体中没有完全丧失致病力的突变体, 可能与本研究采用离体叶片接种方法有关。在田间, 甘蔗梢腐病菌主要通过分生孢子进行传播, 在适宜环境条件下萌发后才实现其侵染过程^[45], 而人工接种过程中, 剪叶形成的伤口利于病原菌侵染, 难于判断因分生孢子萌发不同进而影响病原菌侵染的突变体。此外, 直接使用带有病原菌的菌饼接种, 接种体包括菌丝体和分生孢子, 接种量较大, 野生型菌株和突变体接种后症状表现差异不明显, 筛选不到致病力变化不显著的突变体, 这结果与橡胶树胶孢炭疽菌 T-DNA 致病缺陷转化子筛选中遇到的情况^[46]相似。还需提到的是, 在稻瘟菌中, 硫氧还蛋白 MoTrx2 与转录因子 MoAP1 互作调控稻瘟菌在寄主植物细胞的穿透和侵染型菌丝生长, 进而影响其致病力^[47]; 一个定位于线粒体的 β -CA 基因缺失后, 其分生孢子萌发率和致病力均明显下降^[48]。本研究的 FsAT2324 突变株中插入位点为一个编码硫氧还蛋白基因的编码区, 其致病力增强; 突变株 FsAT1899 和 FsAT2418 的 T-DNA 插入位点属于同一 CA 基因的启动子序列, 用菌饼接种也均表现为致病力增强。这是由于硫氧还蛋白和 CA 基因在不同物种中作用机制不同? 还是因为如前所述剪叶形成伤口更利于菌丝侵染的结果? 需要进一步研究证实。今后研究将改变接种方法, 如在离体叶片或者甘蔗幼苗上接种不同浓度的分生

孢子, 通过病斑出现的时间及其大小来判断致病力。已经完成的基因组序列测定结果显示, 甘蔗镰孢菌的基因组约 50 Mb, 可能编码 15 000 余个基因 (数据另文发表), 本研究所构建的突变株库容量偏小, 今后将应用所建立的转化体系继续进行转化, 以期获得更多的突变体, 为甘蔗镰孢菌的致病分子机理和生长发育机制提供基础材料。

参考文献

- [1] 单红丽, 李文凤, 张荣跃, 王晓燕, 李婕, 仓晓燕, 尹炯, 罗志明, 黄应昆. 甘蔗梢腐病暴发流行原因及产量糖分损失测定[J]. 中国糖料, 2018, 40(3): 40-42, 45.
SHAN H L, LI W F, ZHANG R Y, WANG X Y, LI J, CANG X Y, YIN J, LUO Z M, HUANG Y K. Analysis on epidemic reason of sugarcane pokkah boeng and its losses on yield and sucrose content[J]. Sugar Crops of China, 2018, 40(3): 40-42, 45. (in Chinese)
- [2] 单红丽, 王晓燕, 杨昆, 王长秘, 仓晓燕, 黄应昆. 甘蔗新品种及主栽品种对甘蔗梢腐病的自然抗性[J]. 植物保护学报, 2021, 48(4): 766-773.
SHAN H L, WANG X Y, YANG K, WANG C M, CANG X Y, HUANG Y K. Natural resistance of new and main cultivated sugarcane varieties to pokkah boeng[J]. Journal of Plant Protection, 2021, 48(4): 766-773. (in Chinese)
- [3] COSTA M M, MELO M P, GUIMARÃES E A, VEIGA C M O, SANDIN F C, MOREIRA G M, COSTA S S, PFENNING L H. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with pokkah boeng of sugarcane in Brazil[J]. Plant Pathology. 2019, 68(7): 1350-1360.
- [4] LESLIE J F, SUMMERELL B A, BULLOCK S, DOE F J. Description of *Gibberella sacchari* and neotypification of its anamorph *Fusarium sacchari*[J]. Mycologia, 2005, 97(3): 718-724.
- [5] YAO Z, ZOU C, PENG N, ZHU Y, BAO Y, ZHOU Q, WU Q, CHEN B, ZHANG M. Virome identification and characterization of *Fusarium sacchari* and *F. andiyazi*: causative agents of pokkah boeng disease in sugarcane[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 240.
- [6] MENG J R, HAUNG H J, LI Y X, LI Y J, LI J Q, CHEN B S. First report of *Fusarium sacchari* causing sugarcane pokkah boeng in China[J]. Plant Disease, 2020, 104(5): 1553.
- [7] VISWANATHAN R. Status of sugarcane wilt. one hundred years after its occurrence in India[J]. Journal of Sugarcane Research, 2013, 3(2): 86-106.
- [8] PAUL S K, MAHMUD N U, GUPTA D R, ALAM M N, CHAKRABORTY M, ISLAM M T. First report of *Fusarium*

- sacchari* causing sugarcane wilt in Bangladesh[J]. Plant Disease, 2022, 106(1): 319.
- [9] WANG J H, PENG X D, LIN S H, WU A B, HUANG S L. First report of *Fusarium* head blight of wheat caused by *Fusarium sacchari* in China[J]. Plant Disease, 2015, 99(1): 160.
- [10] ZENG L S, ZHAO Z H, LÜ S, XI Z J, LI M H, XI P G, JIANG Z D. The *Fusarium* species isolated from banana and their phylogenetic relationships[J]. Mycosystema, 2013, 32(4): 617-632.
- [11] CUI Y, WU B, PENG A, SONG X, CHEN X. The genome of banana leaf blight pathogen *Fusarium sacchari* str. FS66 harbors widespread gene transfer from *Fusarium oxysporum*[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 629859.
- [12] MUNAWAR A, MARSHALL J W, COX R J, BAILEY A M, LAZARUS C M. Isolation and characterisation of a ferrirhodin synthetase gene from the sugarcane pathogen *Fusarium sacchari*[J]. Chembiochem, 2013, 14(3): 388-394.
- [13] MARSHALL J W, DE MATTOS-SHIPLEY K M J, GHANNAM I A Y, MUNAWAR A, KILLEN J C, LAZARUS C M, COX R J, WILLIS C L, SIMPSON T J. Fusarochromene, a novel tryptophan-derived metabolite from *Fusarium sacchari*[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2021, 19(1): 182-187.
- [14] 黄振, 李慧雪, 周宇明, 暴怡雪, 张木清, 姚伟. 甘蔗梢腐病病原菌 *Fusarium sacchari* Nep1-like 蛋白的筛选鉴定及功能分析[J]. 植物病理学报, 2022, 52(2): 156-164.
HUANG Z, LI H X, ZHOU Y M, BAO Y X, ZHANG M Q, YAO W. Identification and functional analysis of Nep1-like proteins of *Fusarium sacchari*, the pathogen of sugarcane pokkah boeng disease [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2022, 52(2): 156-164. (in Chinese)
- [15] 李慧雪, 黄振, 周宇明, 暴怡雪, 姚姿婷, 张木清, 姚伟. 甘蔗镰孢菌碳水化合物结合模块效应基因 *Fs11724* 的分离鉴定及功能分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(1): 34-42.
LI H X, HUANG Z, ZHOU Y M, BAO Y X, YAO Z T, ZHANG M Q, YAO W. Identification and functional analysis of carbohydrate binding module effector gene *Fs11724* of *Fusarium sacchari*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(1): 34-42. (in Chinese)
- [16] HUANG Z, LI H, ZHOU Y, BAO Y, DUAN Z, WANG C, POWELL C A, CHEN B, ZHANG M, YAO W. Predication of the effector proteins secreted by *Fusarium sacchari* using genomic analysis and heterogenous expression[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(1): 59.
- [17] LI D, TANG Y, LIN J, CAI W. Methods for genetic transformation of filamentous fungi[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 168.
- [18] VILLENA C I F, GOMES R R, FERNANDES L, FLORENCIO C S, BOMBASSARO A, GRISOLIA M E, DA SILVA TRINDADE E, DE HOOG S, VICENTE V A. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Fonsecaea monophora* and *Fonsecaea erecta* for host-environment interaction studies[J]. Journal of Fungi, 2020, 6(4): 325.
- [19] JEONG M H, KIM J A, KANG S, CHOI E D, KIM Y, LEE Y, JEON M J, YU N H, PARK A R, KIM J C, KIM S, PARK S Y. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Xylaria grammica* EL000614, an endolichenic fungus producing graminin[J]. Mycobiology, 2021, 49(5): 491-497.
- [20] ISLAM M N, NIZAM S, VERMA P K. A highly efficient *Agrobacterium* mediated transformation system for chickpea wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* using DsRed-Express to follow root colonisation[J]. Microbiological Research, 2012, 167(6): 332-338.
- [21] MICHIELSE C B, VAN WIJK R, REIJNEN L, CORNELISSEN B J, REP M. Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis[J]. Genome Biology, 2009, 10(1): R4.
- [22] 袁洪波, 侯琰, 周增强, 涂洪涛, 王丽. 梨树腐烂病菌致病力缺陷突变体的筛选和侧翼序列分析[J]. 果树学报, 2021, 38(11): 1966-1974.
YUAN H B, HOU H, ZHOU Z Q, TU H T, WANG L. Screening of pathogenicity defective mutants and analysis of flanking sequence in *Valsa pyri*[J]. Journal of Fruit Science, 2021, 38(11): 1966-1974. (in Chinese)
- [23] 王鑫, 崔一平, 王继华, 张木清. 甘蔗梢腐病串珠镰孢菌 T-DNA 插入突变体的构建及其鉴定分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(2): 630-637.
WANG X, CUI Y P, WANG J H, ZHANG M Q. Construction of T-DNA insertion mutants of *Fusarium moniliforme*-pathogen fungi of pokkah boeng via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and appraisal analysis of insertion mutants[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(2): 630-637. (in Chinese)
- [24] WANG Z P, SUN H J, GUO Q, XU S Q, WANG J H, LIN S H, ZHANG M Q. Artificial inoculation method of pokkah boeng disease of sugarcane and screening of resistant germplasm resources in subtropical China[J]. Sugar Tech, 2017, 19(3): 1-10.
- [25] 姚姿婷. 板栗疫病菌脯氨酸代谢途径与致病力关系研究[D]. 南宁: 广西大学, 2013.
YAO Z T. Characterization of correlation between proline metabolic pathway and virulence in *Cryphonectria para-*

- sitica*[D]. Nanning: Guangxi University, 2013. (in Chinese)
- [26] LIU Y G, WHITTIER R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking[J]. *Genomics*, 1995, 25(3): 674-681.
- [27] ZHANG H, XU W, FENG Z, HONG Z. A low degenerate primer pool improved the efficiency of high-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR to amplify T-DNA flanking sequences in *Arabidopsis thaliana*[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(1): 14.
- [28] MARUTHACHALAM K, KLOSTERMAN S J, KANG S, HAYES R J, SUBBARAO K V. Identification of pathogenicity-related genes in the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated T-DNA insertional mutagenesis[J]. *Molecular Biotechnology*, 2011, 49(3): 209-221.
- [29] MARUTHACHALAM K, NAIR V, RHO H S, CHOI J, KIM S, LEE Y H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18(2): 234-241.
- [30] JOHN E, SINGH K B, OLIVER R P, TAN K C. Transcription factor control of virulence in phytopathogenic fungi[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(7): 858-881.
- [31] MARROQUIN-GUZMAN M, WILSON R A. GATA-dependent glutaminolysis drives appressorium formation in *Magnaporthe oryzae* by suppressing TOR inhibition of cAMP/PKA signaling[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(4): e1004851.
- [32] CHEN X, LI P, LIU H, CHEN X, HUANG J, LUO C, LI G, HSIANG T, COLLINGE D B, ZHENG L. A novel transcription factor UvCGBP1 regulates development and virulence of rice false smut fungus *Ustilaginoidea virens*[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 1563-1579.
- [33] BRACE J L, VANDERWEELE D J, RUDIN C M. Svf1 inhibits reactive oxygen species generation and promotes survival under conditions of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 2005, 22(8): 641-652.
- [34] LI T, JUNG B, PARK S Y, LEE J. Survival factor gene *FgSvf1* is required for normal growth and stress resistance in *Fusarium graminearum*[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2019, 35(5): 393-405.
- [35] YU Y, DU J, WANG Y, ZHANG M, HUANG Z, CAI J, FANG A, YANG Y, QING L, BI C, Cheng J. Survival factor 1 contributes to the oxidative stress response and is required for full virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(7): 895-906.
- [36] YAO D, MACKENZIE B, MING H, VAROQUI H, ZHU H, HEDIGER M A, ERICKSON J D. A novel system A isoform mediating Na⁺/neutral amino acid cotransport[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(30): 22790-22797.
- [37] MARTHO K F, DE MELO A T, TAKAHASHI J P, GUERRA J M, SANTOS D C, PURISCO S U, MELHEM M S, FAZIOLI R D, PHANORD C, SARTORELLI P VALLIM M A, PASCON R C. Amino acid permeases and virulence in *Cryptococcus neoformans*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0163919.
- [38] 刘新春. 稻瘟菌氨基酸通透酶 MoGAP2 和 MoGAP3 的生物学功能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- LIU X C. The biological roles of both general amino acid permeases MoGAP2 and MoGAP3 in *Magnaporthe oryzae*[D]. Changchun: Jilin University, 2021. (in Chinese)
- [39] 宋妍悦. 稻瘟菌氨基酸通透酶 (MoGAP1) 的生物学功能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- SONG Y Y. Biological function analysis of general amino acid permease (MoGAP1) in *Magnaporthe oryzae*[D]. Changchun: Jilin University, 2018. (in Chinese)
- [40] 张楠, 胡坚, 柳志强, 李晓宇. 胶孢炭疽菌寡肽转运蛋白 CgOPT2 的生物学功能[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(8): 3387-3393.
- ZHANG N, HU J, LIU Z Q, LI X Y. Biological function of *Colletotrichum gloeosporioides* oligopeptide transporter CgOPT2[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(8): 3387-3393. (in Chinese)
- [41] CHAGUE V, MAOR R, SHARON A. CgOpt1, a putative oligopeptide transporter from *Colletotrichum gloeosporioides* that is involved in responses to auxin and pathogenicity[J]. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 173.
- [42] ABDUL W, ALIYU S R, LIN L, SEKETE M, CHEN X, OTIENO F J, YANG T, LIN Y, NORVIENYEKU J, WANG Z. Family-four aldehyde dehydrogenases play an indispensable role in the pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 980.
- [43] YANG Q, JIANG J, MAYR C, HAHN M, MA Z. Involvement of two type 2C protein phosphatases BcPtc1 and BcPtc3 in the regulation of multiple stress tolerance and virulence of *Botrytis cinerea*[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(10): 2696-2711.
- [44] NUNEZ-RODRIGUEZ J C, RUIZ-ROLDAN C, LEMOS P, MEMBRIVES S, HERA C. The phosphatase Ptc6 is involved in virulence and MAPK signalling in *Fusarium oxysporum*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(2): 206-217.
- [45] 刘丹丹, 姚姿婷, 赖小群, 姚潇, 张木清, 邹承武, 陈保善. 甘蔗梢腐病轮枝镰刀菌侵染甘蔗叶片的显微观察[J]. *中国糖料*, 2019, 41(4): 41-45.
- LIU D D, YAO Z T, LAI X Q, YAO X, ZHANG M Q, ZOU

- C W, CHEN B S. Microscopic observation on the infection of sugarcane leaves by pokkah boeng pathogen *Fusarium verticillioides*[J]. Sugar Crops of China, 2019, 41(4): 41-45. (in Chinese)
- [46] 蔡志英, 林春花, 时涛, 霍姗姗, 蔡吉苗, 刘先宝, 黄贵修. 橡胶树胶孢炭疽菌 T-DNA 插入突变体库构建及其致病缺陷转化子筛选[J]. 微生物学通报, 2012, 39(6): 773-780. CAI Z Y, LIN C H, SHI T, HUO S S, CAI J M, LIU X B, HUANG G X. Generation of a transformant library of *Colletotrichum gloeosporioides* by ATMT and screen of the mutants defective in pathogenicity[J]. Microbiology China, 2012, 39(6): 773-780. (in Chinese)
- [47] WANG J, YIN Z, TANG W, CAI X, GAO C, ZHANG H, ZHENG X, WANG P, ZHANG Z. The thioredoxin MoTrx2 protein mediates reactive oxygen species (ROS) balance and controls pathogenicity as a target of the transcription factor MoAP1 in *Magnaporthe oryzae*[J]. Molecular Plant Pathology, 2017, 18(9): 1199-1209.
- [48] DANG Y, WEI Y, BATOOL W, SUN X, LI X, ZHANG S H. Contribution of the mitochondrial carbonic anhydrase (MoCA1) to conidiogenesis and pathogenesis in *Magnaporthe oryzae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 845570.