

何丽云, 张树林, 崔百元, 朱庆锋, 刘圣杰, 刘文华. 根癌农杆菌介导的遗传转化及其在稻瘟病菌中的应 [J]. 广东农业科学, 2019, 46(3): 93-100.

根癌农杆菌介导的遗传转化及其在稻瘟病菌中的应用

何丽云¹, 张树林², 崔百元¹, 朱庆锋¹, 刘圣杰¹, 刘文华¹

(1. 广东省农业科学院农业生物基因研究中心, 广东 广州 510640;
2. 广东省农业科学院水稻研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 根癌农杆菌介导的遗传转化(ATMT)技术是近20年发展起来的真菌研究中最具变革性的技术之一,它作为一种转化工具已被广泛应用于真菌基因功能研究中,使人们对真菌基因组学的理解有了很大的改变。利用ATMT获得随机的T-DNA插入突变体库,结合突变体菌株表型筛选,使许多过程的遗传基础得到阐明。ATMT法具有操作简单,转化受体广泛,转化效率高以及转化子遗传稳定性高等优势。稻瘟病菌是植物十大重要真菌之一,是引发水稻稻瘟病的病原真菌。目前,培育水稻抗病品种是控制稻瘟病最经济和环保的方法。通过克隆稻瘟病菌相关致病基因并研究其功能,在解释致病机理和生理特性,以及培育抗病品种方面具有重要的理论和实践意义。以根癌农杆菌为介导的遗传转化为稻瘟病菌的插入突变、基因敲除和标记克隆等方面研究提供了一个重要工具。针对根癌农杆菌介导的遗传转化原理、特点、步骤、影响因素以及该技术在稻瘟病菌功能基因组学研究中的应用进行综述,以期能够为稻瘟病菌等真菌的遗传转化方面研究提供相关的参考。

关键词: 根癌农杆菌; 遗传转化; 稻瘟病菌; 功能基因; 突变体库

中图分类号: S432.4+4

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X(2019)03-0093-08

Application of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation in *Magnaporthe oryzae*

HE Liyun¹, ZHANG Shulin², CUI Baiyuan¹, ZHU Qingfeng¹, LIU Shengjie¹, LIU Wenhua¹

(1. *Agro-biological Gene Research Center, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;*
2. *Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China*)

Abstract: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) is one of the most revolutionary techniques in fungal research in recent 20 years. As a transformation tool, it has been widely used in the study of fungal gene function, which made people have a better understanding of fungal genomics. Combined with phenotype screening of mutants, random T-DNA obtained by ATMT was inserted into mutant library and the genetic basis of many processes was elucidated. ATMT possesses the advantages of simple operation, wide transformation receptors, high transformation efficiency and high stability of transformants etc. *Magnaporthe oryzae*, one of the top ten important fungi in plants, is the pathogenic fungus that causes rice blast. At present, the most economical and environmentally-friendly method to control rice blast is to cultivate rice resistant varieties. It is of great theoretical and practical significance to explain the pathogenic mechanism and physiological characteristics and cultivate disease-resistant varieties by cloning the

收稿日期: 2019-01-10

基金项目: 广东省自然科学基金(2014A030313572); 广州市科技计划项目(201607010339)

作者简介: 何丽云(1989—), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向为稻瘟病菌致病机制, E-mail: liyunh697901@163.com

通信作者: 刘文华(1968—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为植物抗病分子机理, E-mail: 1827624353@qq.com

pathogenic genes related to *Magnaporthe oryzae* and studying their functions. ATMT provided an important tool for the study of insertion mutation, gene knockout and marker cloning of *Magnaporthe oryzae*. The principle, characteristics, steps, and influencing factors of ATMT and its application in functional genomics study of *Magnaporthe oryzae* were reviewed in order to provide relevant references for the study of genetic transformation of fungi such as *Magnaporthe oryzae* etc.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation; *Magnaporthe oryzae*; functional gene; mutants library

水稻是世界上最重要的粮食作物之一，全球半数以上人口以大米为主食。在我国，水稻种植面积达 3 000 万 hm^2 ，约占所有粮食作物种植面积的 27%，年均总产量占世界稻谷总产量的 35.3%，居世界首位^[1]。由稻瘟病菌〔*Magnaporthe oryzae*, 无性态: *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc〕引起的稻瘟病是一种世界性的水稻病害，它与白叶枯病、纹枯病并称为水稻三大病害。至今，已有 85 个国家报道有稻瘟病发生，全球每年由该病害造成的水稻产量损失达 10%~35%，经济损失达数十亿美元^[2-3]。除侵染水稻外，稻瘟病菌也能侵染并危害其他重要的谷类作物，如小麦、小米、高粱、黑麦和玉米等，因此稻瘟病菌被认为是世界上最重要的植物病原真菌^[4]。此外，稻瘟病菌由于其具有广泛的遗传和分子变异性，且与水稻间的相互作用符合基因对基因关系，现已成为研究植物-病原菌互作机制的模式病原菌之一。随着全基因组测序技术的出现以及高通量测序策略的后续应用已成功地为超过 50 个稻瘟病菌分离株做了基因组测序^[5]，稻瘟病菌的生物学研究进入了功能基因组学时代。因此，研究基因功能，特别是效应子基因功能，在解释稻瘟病菌的致病机制和生理特性，以及对稻瘟病的防治等方面具有重要的理论和实践意义。遗传转化作为一种重要的基因功能研究的辅助手段，可以实现外源基因导入受体细胞，进而研究该目的基因的功能。

目前，实现丝状真菌遗传转化常用的方法包括 CaCl_2 -PEG 转化法、电击转化法、醋酸锂转化法、基因枪法、限制性内切酶介导转化法 REMI 以及根癌农杆菌介导的转化法。根癌农杆菌介导的遗传转化 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 因操作方便，转化效率高及重复性好等特点而被广泛应用。自 Bundock 等^[6]首次应用 ATMT 技术成功实现了对酿酒酵母的高效转化，随后，Groot 等^[7]利用 ATMT 技术对 6 种丝状真菌进行转化，构建了丝状真菌遗传转化体系，这项技术便得到迅速发展。目前，利用该

方法成功转化的真菌已近 100 种^[8]。2001 年，Rho 等^[9]首次利用 ATMT 技术成功实现了对稻瘟病菌的转化，为稻瘟病菌的遗传转化提供了一个重要工具。本文对 ATMT 技术的转化原理、特点、步骤、影响因素以及该方法在稻瘟病菌功能基因组学研究中的应用进行综述，以期能够为稻瘟病菌等真菌的遗传转化方面研究提供相关的参考。

1 ATMT 技术的转化原理和特点

1.1 转化原理

ATMT 是一种依据农杆菌能够侵染植物的特点将外源基因导入植物基因组中使目的基因表达的方法，它最初被应用于植物的转基因研究中。根癌农杆菌属于革兰氏阴性土壤杆菌，它能将自身 Tumor-inducing (Ti) 质粒的一段 DNA (T-DNA) 经伤口转移到植物的基因组中，从而使植物损伤部位形成冠瘿瘤。由于 T-DNA 在转化过程中不受序列特异性的影响，因此可借助分子克隆技术将内源的 T-DNA 替换成外源基因来完成遗传转化，最终得到可以表达外源基因的植物或真菌^[10]。已有研究表明，根癌农杆菌介导稻瘟病菌等丝状真菌遗传转化的机理与其介导植物的遗传转化相类似，都包括农杆菌在宿主细胞上的吸附，Ti 质粒上的 *Vir* 基因的激活，T-DNA 切割、包装、转移和加工等过程^[11]。

在实验过程中，通常利用一些酚类化合物，如乙酰丁香酮 (AS)，诱导 Ti 质粒上 *Vir* 基因的表达，合成 T-DNA 转移所需的一些蛋白质。*VirA* 和 *VirG* 是 *Vir* 基因表达的主控基因，*VirA* 被酚类物质激活后自动磷酸化并使 *VirG* 磷酸化，从而激活其他 *Vir* 基因的转录，合成用于编码 T-DNA 加工、转移和整合的功能蛋白^[12]。所以，*Vir* 基因的活化是农杆菌转化的开关，当酚类物质浓度过高或者导致 *Vir* 基因诱导物减少时会对农杆菌产生毒害作用，不利于 T-DNA 的进入或整合^[11]。

1.2 转化特点

1.2.1 转化受体多样性 相比于传统的遗传转化

方法, 如 PEG-CaCl₂ 法、醋酸锂法、基因枪法等, ATMT 技术最明显的优点就是其转化受体的多样性。它除了可以利用原生质体作为初始材料外, 还可以利用分生孢子, 菌丝体和子实体组织等作为受体, 突破了原来仅依靠原生质体完成遗传转化的局限性, 使得整个转化过程方便, 易于操作。因此对一些难以制备原生质体的真菌来说, 农杆菌介导的遗传转化法是一个较好的选择。姜宁等^[13]以香菇的孢子单核体、原生质体单核体和双核体菌株为转化受体, 均获得了能够稳定遗传的香菇转化菌株。2001 年, Rho 等^[9]首次利用 ATMT 系统成功地实现了对稻瘟病菌孢子的遗传转化。

1.2.2 转化高效性 与丝状真菌的其他转化方法相比, ATMT 法转化效率明显提高, 可达到 300~7 200 个转化子/10⁷ 个细胞, 是传统遗传转化方法的 100~1 000 倍^[7, 14]。Meyer 等^[15]研究表明, 利用 ATMT 技术转化 *Aspergillus giganteus* 的分生孢子, 其转化效率比 PEG 法高 140 倍。

1.2.3 转化子遗传稳定性高 选择单核的分生孢子作为 ATMT 转化的初始材料, 获得的转化子相比于其他方法, 其转化子遗传稳定性更高。*M. purpureus* 的 ATMT 转化子经 4 轮孢子培养及筛选后, 98% 的转化子仍然具有潮霉素抗性, 而利用 PEG 方法获得的转化子, 只有 60% 的转化子表现出对潮霉素具有抗性^[16]。在 *Agaricus bisporus* 的 50 个 ATMT 转化子中, 经过 5 轮孢子的培养及筛选后, 其中 42 个转化子仍然表现出对潮霉素的抗性, 稳定性高达 85%^[17]。

1.2.4 T-DNA 单拷贝插入比例较高 ATMT 的非同源转化, 通常使 T-DNA 以单拷贝形式整合到受体菌株的染色体上。研究表明, ATMT 法转化的突变体 90% 以上都是 DNA 插入引起的^[18], 通过随机挑选 12 个稻瘟病菌转化子, 其中 8 个为单拷贝插入, 单拷贝插入频率达到 66%, 而 REMI 方法转化的 *Glomerella graminicola* 突变体 DNA 插入不到 20%^[19]。Guo 等^[20]通过 PCR 扩增和 Southern 杂交表明, 在随机选择的 56 个稻瘟病菌转化子中, 96% 的稻瘟病菌转化子都为单拷贝插入。

ATMT 转化技术也存在一定的缺点, 主要表现在: (1) 有时仍会出现多拷贝插入, 给表型分

析和基因分离造成困难; (2) 工作量大, 建立基因组范围的饱和突变, 需要的突变体数量极大, 以稻瘟病菌为例, 理论上要建立一个饱和的水稻稻瘟病菌突变体库要 3 万~4 万个突变体; (3) 受寄主范围限制。

2 ATMT 转化稻瘟病菌的步骤

2.1 双元载体的构建及工程菌株的制备

进行遗传转化实验, 首先需要构建符合实验目的的双元载体。双元载体上需携带适合真菌启动子和终止子的抗性筛选标记基因, 如潮霉素 B 基因。通过设计合适的引物扩增获得目的基因片段, 再利用酶切和连接的方法, 使目的基因片段插入到 T-DNA 的左、右边界之间。构建好的双元载体可通过冻融法或电击转化法等方法导入根癌农杆菌中, 从而获得携带外源基因的工程菌株。

2.2 工程菌株的培养与处理

从 LB 平板上挑取含有双元载体的农杆菌单克隆菌落接种于 50 mL 含有合适抗生素的 LB 液体培养基中, 于 28 °C、220 r/min 振荡培养至对数生长期, 取出培养物, 按照 1:100 比例重悬菌体于 IM+AS 液体培养基中, 继续振荡培养 4~6 h, 调节农杆菌 OD₆₀₀ 为 0.3~0.5 左右, 作转化供体备用。

2.3 稻瘟病菌分生孢子的培养与制备

稻瘟病菌接种在米糠或燕麦培养基上, 置于 28 °C 光照培养箱内连续培养 10 d 左右, 促使其产孢。孢子培养后在培养基中加入 5 mL 灭菌蒸馏水, 用无菌刮勺轻刮洗干菌体表面, 洗下孢子, 用两层灭菌擦镜纸过滤收集孢子。

2.4 共培养及转化子的筛选、鉴定

将上述农杆菌液与孢子液等体积混合, 取 150 μL 混合液均匀涂布在铺有硝酸纤维滤膜或微孔滤膜并含有 AS 的 IM 固体培养基上, 22~25 °C 暗培养 2~3 d 后, 将上述膜用无菌剪刀剪成 0.5 cm 条状, 正向贴于含有潮霉素 B, 头孢霉素和羧苄青霉素的筛选培养基 CM 上, 条与条之间留出适当距离, 便于转化子的生长。28 °C 下培养 4~7 d 后挑取转化子至新的筛选培养基上。最后, 对获得的转化子提取基因组 DNA, 通过 PCR 扩增和 Southern 杂交来鉴定筛选疑似转化子以及插入 T-DNA 的拷贝数。

3 影响 ATMT 转化效率的主要因素

3.1 乙酰丁香酮 AS 的浓度

许多研究表明,在 ATMT 转化共培养阶段需要加入 AS 来诱导 *Vir* 基因的表达,因此 AS 的浓度是整个转化过程中最关键的影响因素。在共培养阶段,通常 AS 浓度与 ATMT 转化效率之间呈现出一个单峰型曲线的关系,最适浓度为 200~300 $\mu\text{mol/L}$ 。例如在对芽枝霉菌 *Cladosporium cladosporioides* 进行遗传转化时,AS 的最适浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ [21];在转化淡紫拟青霉 *Paecilomyces lilacinus* 和香蕉枯萎菌时,AS 浓度高于 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,转效率较高,但过高的浓度反而会影响转化效率 [22-23]。但在根癌农杆菌的预培养过程中是否一定需要加入 AS 还未形成定论。例如,在转化在球状白僵菌,尖孢镰刀菌时,预培养阶段不加入 AS,会显著地影响转化效率 [24-25]。然而,也有研究表明,预培养阶段不需要额外 AS 的加入也可完成转化过程 [26-28]。因此,在对一种新的真菌进行遗传转化实验时,需要在预培养阶段对 AS 的加入与否以及共培养阶段 AS 最佳浓度进行探索,以提高转化效率。针对稻瘟病菌而言,利用 ATMT 系统对其进行转化时,无论是预培养阶段,还是共培养阶段,都需要 AS 的诱导,且当 AS 浓度在 200 $\mu\text{mol/L}$ 时转化效率最高 [29]。

3.2 共培养温度和时间

共培养温度和时间是影响 ATMT 转化的两个重要因素。根癌农杆菌侵染完成需要在合适的温度下,经过一定的时间,才能完成转化,温度过高或过低,筛选过早或过晚,都不利于农杆菌的转化。Sharma 等 [27] 在白腐菌 *Phanerochaete chrysosporium* 的 ATMT 转化过程中,设置 20、23、26、29 $^{\circ}\text{C}$ 4 个共培养温度,结果发现 20 $^{\circ}\text{C}$ 时转化效率最高,29 $^{\circ}\text{C}$ 时转化完全失败。Wang 等 [30] 对土曲霉菌 *Aspergillus terreus* 转化时,分别比较了 22、25、28 $^{\circ}\text{C}$ 对转化效率的影响,发现在 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 转化效率最高,可以达到 350 个转化子/10⁶ 个孢子。Liu 等 [31] 在叶斑病菌 *Curvularia lunata* 的 ATMT 转化时,设置 4 个温度梯度 (19、22、25、28 $^{\circ}\text{C}$) 及 2 个共培养时间 (24、48 h),结果表明在 19~25 $^{\circ}\text{C}$ 区间内,在这 2 个共培养时间条件下,转化子均随着温度升高而增

加,但当温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 时,2 个共培养时间获得转化子的数量非常少,最终确定最适共培养时间和温度为 48 h 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 。目前有学者认为 ATMT 介导的真菌遗传转化所需温度为 22~25 $^{\circ}\text{C}$,但事实上不同的真菌其温度并非都在此范围内 [32]。

根癌农杆菌和真菌都需要在合适的温度下生存,其转化所需要的酶也只能在特定的温度下催化效率最高,因此在具体的研究过程中,需要自己探索出合适的温度。共培养的时间过短,得到的转化子较少,不利于后续的实验;共培养时间过长,会使插入的 T-DNA 拷贝数增加,并且潮霉素抑制效果会减弱,产生背景干扰,导致假阳性转化子的出现。例如,地衣真菌 *Umbilicaria muehlenbergii* 遗传转化时,相比于 24 h 或 36 h 的培养时间,48 h 获得的转化子增加 64 倍,达到 27~98 个转化子/10⁶ 个孢子,但是长时间的共培养使得单拷贝 T-DNA 插入的频率下降 10%~15% [33]。针对稻瘟病菌,张俊华等 [34] 发现,ATMT 转化的共培养最适温度为 28 $^{\circ}\text{C}$,共培养时间为 4 d,这与之前吴毅歆等 [35] 的研究结果类似;而在 Rho 等 [9] 的研究中,其 ATMT 转化采用的共培养时间为 48 h,最适温度为 22 $^{\circ}\text{C}$,这可能是与他们采用的农杆菌菌株及稻瘟病菌菌株的类型不同有关,前者所采用的农杆菌为 C58C1,稻瘟病菌为 CY2,而后者采用的农杆菌为 AGL-1,稻瘟病菌为 70-15。

3.3 农杆菌菌株类型

在 ATMT 转化过程中,转化效率也受根癌农杆菌菌株类型的影响。目前较为常用的农杆菌菌株有 5 种,分别是 EHA105、AGL-1、LBA1100、LBA4404 和 C58C1,在不同真菌转化过程中,所使用的菌株也不同。Lu 等 [36] 对玉米灰斑病菌 *Cercospora zea-maydis* 进行 ATMT 转化时,比较了 AGL-1、LBA4404 和 EHA105 菌株的转化效率,结果发现 AGL-1 的转化效率最高,分别为 LBA4404 菌株的 4 倍、EHA105 菌株的 2 倍。在青霉菌 *Penicillium chrysogenum* 的 ATMT 转化时,AGL-1 菌株的转化效率要比 LBA1100 菌株高出 2~3 倍 [37]。Liu 等 [38] 在进行紫杉醇产生菌 *Ozonium* sp. EFY21 的转化时,发现 EHA105 菌株的效率最高,而 AGL-1 和 LBA4404 菌株的转化很少成功甚至得不到转化子。因此,不同真菌的 ATMT 转化对农杆菌菌株具有一定的选择性,在

具体的实验过程中需要进行探索找到合适的农杆菌菌株。目前在稻瘟病菌的 ATMT 转化中,常用的农杆菌菌株有 AGL-1、C58C1 和 EHA105,针对这 3 种农杆菌的转化效率比较研究尚未见报道。

3.4 真菌受体与农杆菌的浓度

在一定范围内,随着真菌受体和农杆菌浓度的增加,ATMT 转化效率也会提高。如 Zhang 等^[39]对芦笋茎枯病菌 *Phomopsis asparagi* 的遗传转化,发现当孢子浓度在 $10^3\sim 10^6$ CFU/mL 范围内,农杆菌的 OD_{600} 值为 0.2~0.5 时,转化效率随着真菌浓度和农杆菌增加转化效率也随之增加,但当真菌浓度提高到 10^7 CFU/mL 时,或农杆菌 OD_{600} 值为 0.6 时,其转化效率反而显著下降。Wang 等^[40]进行苹果腐烂菌的遗传转化时,当真菌孢子浓度为 10^6 CFU/mL 时,其转化效率最高。李敏慧等^[23]在对稻瘟病菌的遗传转化时,当孢子浓度为 10^6 CFU/mL、农杆菌的 OD_{600} 值为 0.4 时,其转化效率最高。Rho 等^[9]发现,当稻瘟病菌孢子浓度和农杆菌浓度比值为 1:2 时,ATMT 的转化效率最高。总之,在转化过程中,当农杆菌浓度过高时,农杆菌会与孢子抢占营养,影响孢子萌发,导致转化率下降。同样,当孢子浓度过高时则会导致真菌的过量生长,影响后期转化子的筛选及单克隆转化子的挑取。因此,针对不同类型的真菌,其 ATMT 转化的真菌和农杆菌的最佳浓度也不同,在具体的研究中,需要对二者的浓度进行探索,进而获得最优转化条件。

4 ATMT 在稻瘟病菌功能基因组学中的应用

4.1 建立 T-DNA 插入突变体库

在稻瘟病菌功能基因组学研究中,突变体库的容量是开展其基因组学研究的前提。建立突变体库需要高效的转化体系,外源标记能够单拷贝随机插入真菌基因组中。利用 ATMT 法建立稻瘟病菌 T-DNA 插入突变体库,丰富的突变体为突变基因的筛选和致病机理的研究提供了良好的平台。Li 等^[41]利用 ATMT 法获得含 6 179 个转化子的稻瘟病菌 T-DNA 随机插入的突变体库,通过 Tail-PCR 扩增,获得 623 个右侧翼序列和 124 个左侧翼序列,对这些序列分析发现,T-DNA 的插入与染色体重排有关,且与植物相比其插入模式更精确更单一。Chen 等^[42]构建了容量为 70 000

个转化子的稻瘟病菌突变体库,利用 Tail-PCR 扩增 T-DNA 左右侧翼序列,发现其中 1 个转化子 SX11404 插入了 2 个假定基因 MGG_01597.5 和 MGG_11181.5。吴毅歆等^[35]构建了含 8 000 个转化子的稻瘟病菌突变体库,通过接种鉴定转化子的致病性,获得了 20 个致病突变体。Jeon J 等^[43]对构建的稻瘟病菌突变体库通过高通量表型和基因型的筛选,利用 Tail-PCR 得到 741 个 T-DNA 标记位点,并发现了 202 个新的致病位点。探索更有效的筛选基因突变体的方法,建立高效率的突变体库,是今后稻瘟病菌功能基因组学研究的一项重要基础工作。

4.2 目的基因的敲除或定点突变

研究基因功能最直接方式就是对该基因进行基因敲除。将一段目的基因的同源片段连接在 T-DNA 内部的两侧翼,构建目的基因的打靶载体,然后利用 ATMT 转化法,实现对该目的基因的定向失活,得到突变体,再根据表型变化对该基因进行功能鉴定。Peng 等^[44]利用 ATMT 法,获得稻瘟病菌 *MoDUO1* 敲除突变体,突变体的营养生长和分生孢子形态都有着明显的缺陷,接种水稻后,仅触发微小的病变,从而表明 *MoDUO1* 是稻瘟病菌发挥毒性所必需的。Wang 等^[45]敲除稻瘟病菌致病基因 *MoCPS1* 获得的突变菌株 $\Delta MoCps1$,发现该突变菌株的产孢能力明显下降,仅有野生型的 20%,且其孢子的长度和宽度都显著不同于野生型,证明了 *MoCPS1* 在稻瘟病菌的产孢过程和分生孢子形态发生中具有重要作用。Mogga 等^[46]对稻瘟病菌效应子 *MoHEG16* 敲除后发现,突变菌株在附着胞形成阶段受阻且菌丝的定殖量明显降低,证明该效应子是稻瘟病菌早期侵染阶段所必需的。Guo 等^[20]以 Guy11 为受体菌株,构建了单个氨基酸替换 H245L 的突变菌株 *Mosdi1*,与野生型相比,该突变菌株对农药萎锈灵具有高度抗性。Zhang 等^[47]通过构建稻瘟病菌无毒基因 *AvrPib* 的单突变或双突变以及缺失突变等 14 种突变体,接种鉴定结果表明转座子的插入以及编码区的缺失均导致该基因丧失其无毒性功能,由此阐明了 *AvrPib* 等位基因遗传多样性产生的分子机制。

4.3 标记和克隆相关基因

ATMT 法产生的 T-DNA 插入突变子不仅能稳定遗传,而且大多数以单拷贝形式整合进基因组,

基因组 DNA 不会发生重排和切断现象, 这些为高效地获得标记突变体、分离、克隆相关基因提供了崭新的途径。例如, 吴小燕等^[48]利用 ATMT 法对稻瘟病菌进行转化, 获得一株致病性增强菌株 B11, 利用 Tail-PCR 法获得了 T-DNA 插入序列, 并成功克隆了相关基因 *MgThiJ1*, 对该基因进行分析发现该基因可能参与稻瘟病菌菌丝生长及病斑扩展过程, 并且具有一定的负调控作用。孔丹丹^[49]利用该法获得一个稻瘟病菌 KD-560 突变体, 通过表型鉴定, 该突变体不能侵染大麦及水稻叶片, 采用 hiTAIL-PCR 的方法扩增了 T-DNA 右边界的序列, 成功地克隆了相关基因 MoCYP537A3。

5 展望

近 20 年来, ATMT 作为一种重要的遗传转化工具, 它能够多个基因共同转化到真菌细胞中, 目前已被应用于由锌指核酸酶 (ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶 (TALENs) 和 CRISPR/Cas 系统所介导的真菌基因组编辑中。尤其是近年来兴起的 CRISPR/Cas 基因组编辑系统, 作为一种新的基因功能研究利器, 但 ATMT 仍然是 CRISPR/Cas 基因编辑后期实现真菌遗传转化的重要的工具。虽然全面确定真菌中的基因功能, 最终发掘这些基因的潜在意义, 这一目标短期内难以实现, 但 ATMT 在定义众多不同性状背后的遗传基础方面却取得了许多里程碑式的进展, 而且它将继续为我们对真菌生物学的研究发挥重要的作用。目前, ATMT 在很多新的真菌中实现遗传转化, 各种真菌的基因组突变体库的构建取得很大的进展, 这些问题的解决有利于深入的研究致病基因的功能。然而, 目前对于该技术的报道都较为基础, 多数涉及的是对转化条件的摸索, 而对进一步的相关基因的筛选及功能验证较少。

ATMT 对稻瘟病菌的生物学研究有两个重要的贡献: 一方面是通过筛选数以万计的 T-DNA 插入突变体进行正向遗传学分析; 另一方面是建立基因替换菌株, 然后在植物上进行致病性测试。这两方面的研究都是阐明稻瘟病菌致病机理的重要步骤, 所以在具体的研究中, 我们有必要建立稻瘟病菌完善、高效的 ATMT 转化方法, 充分的发挥该方法的优点, 彻底的弄清稻瘟病菌致病相关基因的功能, 推进水稻抗性品种的培育进程。

虽然, 目前对 ATMT 转化的机制研究相对清晰, 但转化成功与否仍受多方面因素的影响, 这就要求研究者对其条件进行探索, 本综述详细分析了 ATMT 转化中的影响因素, 可以为未来的研究者提供一定的参考。

参考文献 (References):

- [1] 陈卫华, 甘雨, 黄宗洪, 向关伦, 杨占烈, 潘建慧, 郭慧. 健优 388 在长江上游稻区的主要农艺性状表现分析[J]. 广东农业科学, 2015, 42(1): 4-7. doi:10.16768/j.issn.1004-874X.2015.01.024.
CHEN W H, GAN Y, HUANG Z H, XIANG G L, YANG Z L, PAN J H, GUO H. Analysis of agronomic traits for Jianyou 388 in upper rice region of Yangtze River [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 42(1): 4-7. doi:10.16768/j.issn.1004-874X.2015.01.024.
- [2] FISHER M C, HENK D A, BRIGGS C J, BROWNSTEIN J S, MADOFF L C, MCCRAW S L, GURR S J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health [J]. *Nature*, 2012, 484(7393): 186-194.
- [3] 谭明辉, 霍光华, 彭玉萌, 李芳. 木荷和无患子等植物组方杀稻瘟剂的药效及其安全性[J]. 广东农业科学, 2014, 41(16): 85-89. doi:10.16768/j.issn.1004-874X.2014.16.020.
TAN M H, HUO G H, PENG Y M, LI F. Efficacy and safety of blasticidin agent prepared by *Schima superba*, *Sapindus mukorossi* and other plants [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(16): 85-89. doi:10.16768/j.issn.1004-874X.2014.16.020.
- [4] ZHONG Z H, NORVIENYERU J, CHEN M L. Directional selection from host plants is a major force driving host specificity in *Magnaporthe* species [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25591.
- [5] BAO J D, CHEN M L, ZHONG Z H. PacBio sequencing reveals transposable elements as a key contributor to genomic plasticity and virulence variation in *Magnaporthe oryzae* [J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(11): 1465-1468.
- [6] BUNDOCK P, DULK - RAS A, BEIJERSBERGEN A, HOOYKAAS P J. Trans - kingdom T - DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *The EMBO Journal*, 1995, 14(13): 3206-3214.
- [7] GROOT M J A, BUNDOCK P, HOOYKAAS P J J, BEIJERSBERGEN A G M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi [J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(9): 839-842.
- [8] 陈东亮, 李纪元, 范正琪, 范妙华. 根癌农杆菌介导真菌遗传转化的影响因素及应用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(7): 3317-3320.
CHEN D L, LI J Y, FAN Z Q, FAN M H. Influencing factors of genetic transformation in fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and its application [J]. *Journal of Anhui Agriculture science*, 2010, 38(7): 3317-3320.
- [9] RHO H S, KANG S, LEE Y H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea* [J]. *Molecules and Cells*, 2001, 12(3): 407-411.

- [10] LACROIX B, TZFIRA T, VAINSTEIN A, CITOVSKY V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners [J]. *Trends in Genetics*, 2006, 22(1): 29–37.
- [11] 王栋鑫, 彭隼, 张爽. 农杆菌介导木本植物遗传转化的研究进展[J]. 北方园艺, 2018 (2): 181–185. doi: 10.11937/bfyy.20173329.
WANG D X, PENG D, ZHANG S. Advances in *Agrobacterium*-mediated transformation of woody plants [J]. *Northern Horticulture*, 2018(2): 181–185. doi:10.11937/bfyy.20173329.
- [12] 邹智. 农杆菌 vir 基因诱导因子研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(7): 126–132. doi:10.13523/j.cb.20110721.
ZOU Z. Advances on factors influencing induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes [J]. *China Biotechnology*, 2011, 31(7): 126–132. doi:10.13523/j.cb.20110721.
- [13] 姜宁, 宋春艳, 刘建雨, 谭琦, 章炉军, 尚晓冬. 农杆菌介导香菇菌丝遗传转化体系的研究[J]. 菌物学报, 2017, 36(11): 1514–1523. doi:10.13346/j.mycosystema.170041.
JIANG N, SONG C Y, LIU J Y, TAN Q, ZHANG L J, SHANG X D. *Agrobacterium*-mediated transformation of the *Lentinula edodes* mycelia [J]. *Mycosystema*, 2017, 36(11): 1514–1523. doi:10.13346/j.mycosystema.170041.
- [14] 高兴喜, 杨谦, 宋金柱, 郭兆奎. 根癌农杆菌介导的木霉菌遗传转化方法[J]. 高技术通讯, 2004, 5: 31–34.
GAO X X, YANG Q, SONG J Z, GUO Z K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Trichoderma Harzianum* [J]. *High Technology Letters*, 2004, 5: 31–34.
- [15] MEYER V, MUELLER D, STROWIG T, STAHL U. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus* [J]. *Current Genetic*, 2003, 43(5): 371–377.
- [16] CAMPOY S, PEREZ F, MARTIN J F, GUTIERREZ S, LIRAS P. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer [J]. *Current Genetics*, 2003, 43(6): 447–452.
- [17] LIU J Y, SONG C Y, LI Q Z, XU Z, ZHANG D, ZHANG M Y, TAN Q, SHANG X D. A colonized millet grain method for *Agrobacterium*-mediated transformation of the button mushroom *Agaricus bisporus* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2018, 152: 148–153.
- [18] 王宏宇. 稻瘟病菌 T-DNA 插入突变研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2003.
WANG H Y. T-DNA insertional mutagenesis of *Magnaporthe grisea* [D]. Fuzhou: Fujinag Agriculture and Forestry University, 2003.
- [19] EPSTEIN L, LUSNAK K S. Transformation-mediated developmental mutants of *Glomerella graminicola* (*Collectrichum graminicola*) [J]. *Fungal Genetic Biology*, 1998, 23(2): 189–203.
- [20] GUO M, ZHU X L, LI H X, TAN L Y, PAN Y M. Development of a novel strategy for fungal transformation based on a mutant locus conferring carboxin-resistance in *Magnaporthe oryzae* [J]. *AMB Express*, 2016, 6(1): 57.
- [21] ZHANG P, LIU T T, ZHOU P P, LI S T, YU L J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of a taxol-producing endophytic fungus, *Cladosporium cladosporioides* MD2 [J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(4): 1315–1320.
- [22] 王曦苗, 朴春根, 李虹, 汪来发, 郭民伟, 李永, 刘晓莉. 根癌农杆菌介导的淡紫拟青霉遗传转化体系的建立[J]. 林业科学, 2010, 46(10): 95–102.
WANG X Z, PU C G, LI H, WANG L F, GUO M W, LI Y, LIU X L. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system of *Paecilomyces lilacinus* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2010, 46(10): 95–102.
- [23] 李敏慧, 张荣, 姜大刚, 习平根, 庄楚雄, 姜子德. 根癌农杆菌介导的香蕉枯萎病菌 4 号生理小种的转化[J]. 植物病理学报, 2009, 39(4): 405–412.
LI M H, ZHANG R, JIANG D G, XI P G, ZHUANG C X, JIANG Z D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 [J]. *Acta Phytopathologica Phytopathologica Sinica*, 2009, 39(4): 405–412.
- [24] LECLERQUE A, WAN H, ABSCHÜTZ A, CHEN S, MITINA G V, ZIMMERMANN G, SCHAIRER H U. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* [J]. *Current Genetics*, 2004, 45(2): 111–119.
- [25] MULLINS E D, KANG S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58(14): 2043–2052.
- [26] TAKAHARA H, TSUJI G, KUBO Y, YAMAMOTO M, TOYODA K, INAGAKI Y, ICHINOSE Y, SHIRAIISHI T. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii* [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2004, 70(2): 93–96.
- [27] SHARMA K K, KUHAD R C. Genetic transformation of lignin degrading fungi facilitated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *BMC Biotechnology*, 2010, 10(1): 67.
- [28] ZHENG Z, HUANG C, CAO L, XIE C, HAN L. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in medicinal fungus *Cordyceps militaris* [J]. *Fungal Biology*, 2011, 115(3): 265–274.
- [29] LIU N, CHEN G Q, NING G A, SHI H B, ZHANG L C, LU J P, MAO L J, FENG X X, LIU X H, SU Z Z, LIN F C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: An efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption in *Harpophora oryzae* [J]. *Microbiological Research*, 2016, 182: 40–48.
- [30] WANG D, HE D, LI G, GAO S, LV H Y, SHAN Q S, WANG L. An efficient tool for random insertional mutagenesis: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus terreus* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 98: 114–118.
- [31] LIU T, LIU L, JIANG X, HOU J M, FU K H, ZHOU F H, CHEN J. *Agrobacterium*-mediated transformation as a useful tool for the molecular genetic study of the phytopathogen *Curvularia lunata* [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 126(3): 363–371.

- [32] 李维, 张义正. 根癌农杆菌介导的白腐丝状真菌—黄抱原毛平革菌的转化[J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 784–787.
LI W, ZHANG Y Z. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(5): 784–787.
- [33] PARK S Y, JEONG M H, WANG H Y, KIM J A, YU A H, KIM S B, CHEONG Y H, KANG S C, LEE Y H, HUR J S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the lichen fungus, *Umbilicaria muehlenbergii* [J]. *PloS One*, 2013, 8(12): e83896.
- [34] 张俊华, 刘焯, 韩雨桐, 潘春清, 王中业, 张淋淋, 崔凯旋. 农杆菌介导稻瘟病菌绿色荧光蛋白(GFP)遗传转化研究[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(11): 1–7. doi:10.19720/j.cnki.issn.1005–9369.2014.11.001.
ZHANG J H, LIU Y, HAN Y T, PAN C Q, WANG Z Y, ZHANG L L, CUI K X. GFP genetic transformation of *Magnaporthe grisea* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2014, 45(11): 1–7. doi:10.19720/j.cnki.issn.1005–9369.2014.11.001.
- [35] 吴毅歆, 范成明, 周惠萍, 久保康之, 何月秋. 一种农杆菌介导稻瘟病菌的遗传转化[J]. 植物保护学报, 2008, 35(5): 421–426. doi:10.13802/j.cnki.zwbhxb.2008.05.008.
WU Y X, FAN C M, ZHOU H P, YASUYUKI K B, HE Y Q. A genetic of transformation of *Magnaporthe grisea* by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2008, 35(5): 421–426. doi:10.13802/j.cnki.zwbhxb.2008.05.008.
- [36] LU Y Y, XIAO S Q, WANG F, SUN J Y, ZHAO L K, YAN L B, XUE C S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as an efficient tool for insertional mutagenesis of *Cercospora zeaе-maydis* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2017, 133: 8–13.
- [37] BOER P, BRONKHOF J, DUKIĆ K, KERKMAN R, TOUW H, BERG M, OFFRINGA R. Efficient gene targeting in *Penicillium chrysogenum* using novel *Agrobacterium*-mediated transformation approaches [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, 61: 9–14.
- [38] LIU L, WEI Y M, ZHOU X W. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the Taxol-producing endophytic fungus *Ozonium* sp EFY21 [J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(3): 2913.
- [39] ZHANG Y P, QU H X, ZHAO P, TANG Y P, ZHOU J S, LUO S C, YIN Y L, CHEN G Y. Generation and screening of T-DNA insertion mutants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the garden asparagus stem blight pathogen *Phomopsis asparagi* [J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(11): 1270–1277.
- [40] WANG C X, GUAN X N, WANG H Y, LI G F, DONG X L, WANG G P, LI B H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Valsa mali*: an efficient tool for random insertion mutagenesis [J]. *The Scientific World Journal*, 2013, 2013.
- [41] LI G H, ZHOU Z Z, LIU G H, ZHENG F C, HE C Z. Characterization of T-DNA insertion patterns in the genome of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. *Current Genetics*, 2007, 51(4): 233–243.
- [42] CHEN X L, YANG J, PENG Y L. Large-scale insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation [J]. *Fungal Genomics*, 2011, 722: 213–224.
- [43] JEON J, PARK S Y, CHI M H. Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus [J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(4): 561–565.
- [44] PENG H W, FENG Y J, ZHU X H, LAN X Y, TANG M, WANG J Z, DONG H T, CHEN B S. *MoDUO1*, a *Duo1*-like gene, is required for full virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. *Current Genetics*, 2011, 57(6): 409–420.
- [45] WANG YU, HE D, CHU Y, ZUO Y S, XU X W, CHEN X L, ZHAO W S, ZHANG Y, YANG J, PENG Y L. *MoCps1* is important for conidiation, conidial morphology and virulence in *Magnaporthe oryzae* [J]. *Current Genetics*, 2016, 62(4): 861–871.
- [46] MOGGA V, DELVENTHAL R, WEIDENBACH D, LANGER S, BERTRAM P M, ANDRESEN K, THINES E, KROJ T, SCHAFFRATH U. *Magnaporthe oryzae* effectors *MoHEG13* and *MoHEG16* interfere with host infection and *MoHEG13* counteracts cell death caused by *Magnaporthe*-NLPs in tobacco [J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(5): 1169–1185.
- [47] ZHANG S L, WANG L, WU W H, HE L Y, YANG X F, PAN Q H. Function and evolution of *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPib* responding to the rice blast resistance gene *Pib* [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11642.
- [48] 吴小燕, 王教瑜, 张震, 井金学, 杜新法, 柴荣耀, 毛雪琴, 邱海萍, 姜华, 王艳丽, 孙国昌. 稻瘟病菌致病性增强突变体 B11 的基因分析 [J]. 中国水稻科学, 2009, 23(6): 611–615. doi:10.3969/j.issn.1001–7216.2009.06.08.
WU X Y, WANG J Y, ZHANG Z, JING J X, DU X F, CHAI R Y, MAO X Q, QIU H P, JIANG H, WANG Y L, SUN G C. Analysis on gene locus of *Magnaporthe oryzae* B11, a pathogenicity-enhanced mutant [J]. *Journal of China Rice Science*, 2009, 23(6): 611–615. doi:10.3969/j.issn.1001–7216.2009.06.08.
- [49] 孔丹丹. 稻瘟病菌致病缺陷突变体 KD-560 的获得及标记基因 *MoCYP537A3* 功能的初步研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
KONG D D. The obtaining of a nonpathogenic mutant Kd-560 of *Magnaporthe oryzae* and a primarily functional study on the tagged gene *MoCYP537A3* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.

(责任编辑 杨贤智)