

油菜黑胫病菌 T-DNA 插入诱变因素优化及突变体筛选

杨越寒, 张静, 杨龙, 吴明德, 李国庆*

(湖北省作物病害监测与安全控制重点实验室, 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北 武汉, 430070)

摘要: 油菜黑胫病是由 *Leptosphaeria biglobosa* 引起的一种真菌病害。这种病害在我国油菜产区广泛发生, 并造成一定的经济损失。为通过获取突变体来研究 *L. biglobosa* 的生态适应性机制及致病机制, 本文优化了影响农杆菌介导转化(ATMT)油菜黑胫病菌 *L. biglobosa* 菌株 Lb731 的因素, 评估转化子质量, 并筛选相关突变体。结果明确了农杆菌介导转化菌株 Lb731 的最佳因素: 潮霉素 B 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 转化受体(分生孢子)培养时间为 15 d (20 $^{\circ}\text{C}$), 浓度为 $2 \times 10^{7-8}$ 孢子/mL, 农杆菌-受体共培养温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 共培养时间为 72 h。在最适条件下的转化效率达到 80 个转化子/百万分生孢子。T-DNA 插入基因组的频率为 100%, 单拷贝插入频率为 72.7%, 转化子抗潮霉素性状能稳定遗传。从 2136 个转化子中获得了 11 个菌丝生长减缓突变体, 7 个色素产生缺陷突变体和 14 个分生孢子产生缺陷突变体, 并从这些突变体中鉴定出 7 个致病力丧失突变体。采用 hiTAIL-PCR 技术, 从 3 个突变体中获得了 T-DNA 插入位点侧翼序列。上述结果为深入研究 *L. biglobosa* 的生态适应性机制及致病机制提供了材料和线索。

关键词: 油菜黑胫病菌; 农杆菌介导遗传转化; T-DNA 插入诱变; 突变体筛选

中图分类号: Q785; S565.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-9084(2021)06-1115-11

Optimization of T-DNA insertion-mediated mutagenesis of *Leptosphaeria biglobosa* and mutant screening

YANG Yue-han, ZHANG Jing, YANG Long, WU Ming-de, LI Guo-qing*

(Hubei Key Laboratory of Crop Disease Monitoring and Safety Control, Plant Science and Technology College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Blackleg of oilseed rape (*Brassica* spp.) is caused by *Leptosphaeria biglobosa*, which has been found to occur widely in oilseed rape-producing areas in our country, resulting in a substantial seed yield loss in the industry of oilseed rape. However, the mechanisms for ecological adaptation and pathogenesis of *L. biglobosa* have not been elucidated. Therefore, it is necessary to conduct in-depth studies on molecular mechanisms for ecological adaptation and pathogenesis of *L. biglobosa*. In order to fulfill this objective, this study was done to mutate *L. biglobosa* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT). The contents included optimization of the factors affecting the ATMT, evaluation of the quality of the transformants, and screening of mutants. The results showed that the optimum ATMT factors for *L. biglobosa* Lb731 were: hygromycin B concentration at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, transformation recipients (conidia) from the 15-day-old cultures (20 $^{\circ}\text{C}$), conidial concentration at $2 \times 10^{7-8}$ conidia/mL, co-incubation of *A. tumefaciens*-recipients at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 72 h. The transformation efficiency reached 80 transformants per million conidia on average. The T-DNA insertion frequency reached up to 100% based on PCR assays with 72.7% single-copy insertion among the transformants based on Southern blottings. Results also showed that the hygromycin-resistance trait in the transformants inherited stably through nuclear mitosis. A total of 32 mutants were screened from 2136 transformants, including 11 mutants with suppressed mycelial growth, 7 mutants with deficiency in pigment biosynthesis, and 14 mutants with deficiency in conidial production. Meanwhile, 7 out of the 32 mutants were identified to completely lose pathogenicity (virulence) on oilseed rape. Using the hiTAIL-PCR technique, three DNA sequences flanking the T-DNA-insertion sites were obtained from three mutants. Overall, these results laid a solid

收稿日期: 2020-08-26

基金项目: 国家油菜产业技术体系油菜黑胫病防控岗位(CARS-12)

作者简介: 杨越寒(1996-), 湖北武汉人, 硕士, 研究方向为植物真菌病害, E-mail: 329017660@qq.com

* 通讯作者: 李国庆, 博士, 教授, 研究方向为植物真菌病害及其生物防治, E-mail: guoqingli@mail.hzau.edu.cn

foundation for further elucidation of the molecular mechanisms for ecological adaptation and pathogenesis in *L. biglobosa*.

Key words: *Leptosphaeria biglobosa*; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT); T-DNA insertional mutagenesis; mutant screening

油菜黑胫病(blackleg of oilseed rape)由子囊菌 *Leptosphaeria biglobosa* 引起,其无性态为 *Plenodomus biglobosus*。其姊妹种 *L. maculans*(无性态是 *P. lingam*)引起油菜茎基溃疡病(Phoma stem canker)。值得一提的是油菜茎基溃疡病曾先后在澳大利亚、加拿大、法国、德国和英国等地爆发流行,对油菜产业造成过毁灭性打击^[1,2]。我国2000年正式报道油菜黑胫病^[3],随后进行了发生情况普查、危害损失评估和病原鉴定,结果表明:油菜黑胫病在我国各油菜产区均有发生,在部分地区,油菜黑胫病病株率达到90%以上^[4-6],病原为 *L. biglobosa*^[7-9],与健康植株油菜籽产量相比,发病植株油菜籽产量下降10%~50%^[9,10]。

Leptosphaeria biglobosa 和 *L. maculans* 在地理分布、致病力和致害性等诸多方面存在明显差异。在地理分布方面, *L. maculans* 分布在澳大利亚、新西兰、加拿大、美国和欧洲诸国(如法国、英国、德国、波兰)等地。而 *L. biglobosa* 比 *L. maculans* 的分布区域更广,除分布在上述地区外,在亚洲(如我国)也有分布^[4-9]。在致病力和致害性方面, *L. maculans* 致病力强,致害性大,它往往侵入至油菜茎秆髓部,导致茎秆断裂,从而降低油菜籽结实率和成熟度。相反, *L. biglobosa* 致病力较弱,致害性较小,仅能侵入油菜茎秆皮层,一般不造成茎秆折断,对油菜籽结实率和成熟度影响较小^[1,2]。在生态适应性及致病机制研究方面,前人对 *L. maculans* 研究得较深入,而对 *L. biglobosa* 则研究较少^[11-13]。但是,在我国部分地区, *L. biglobosa* 造成的油菜籽产量损失不可小视^[8-10],有必要对其生态适应机制及致病机制开展深入研究。

近年来,反向遗传学(reversed genetics)技术的发展为深入挖掘植物病原真菌的功能基因(包括生态适应性及致病相关基因)提供了新思路和新方法。这项技术的原理是通过操作相关基因(如突变、基因编辑等),建立基因与表型性状之间的关系,最终明确其生物学功能。对于真菌诱变及构建突变体而言,根癌农杆菌介导转化技术(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)是最重要的,同时也是最成熟的一项技术。从1995年在酿

酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)完成首例ATMT转化到现在,已在100多种真菌中成功实现了ATMT转化,包括多种重要植物病原真菌,如稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)、三叶草刺盘孢(*Colletotrichum trifolii*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)和核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)^[14,15]。Eckert等人^[16]采用ATMT技术将红色荧光蛋白(DsRed)基因和绿色荧光蛋白(GFP)基因导入到 *L. maculans* 和 *L. biglobosa* 中,跟踪其定殖植物及扩散动态。Blaise等人^[17]采用ATMT技术构建了 *L. maculans* 的T-DNA插入体库,并从中筛选致病力缺陷型突变体,用于致病机制研究中。迄今,尚未见采用ATMT技术构建 *L. biglobosa* 插入体库及筛选相关突变体的研究报道。

鉴于此,本研究以油菜黑胫病菌Lb731为出发菌株,优化影响ATMT转化这一菌株的因素,包括转化受体(分生孢子)的培养时间及浓度,以及农杆菌-转化受体共培养温度及时间等。在此基础上构建T-DNA插入体库,并评估其质量,从插入体库中筛选突变体,最终目的是为研究 *L. biglobosa* 的生态适应性机制和致病机制提供材料和线索。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养基

供试油菜黑胫病菌(*L. biglobosa*)菌株Lb731分离自油菜茎秆,2017年采自河南省信阳市。根癌农杆菌菌株EHA105和pTFCM二元载体(含有潮霉素抗性基因)由华中农业大学付艳苹教授惠赠,菌株EHA105感受态细胞由本实验室制备。大肠杆菌Trans 5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术(TransGen Biotech)有限公司。载体质粒PMD18-T购自TaKaRa生物技术有限公司(辽宁省大连市)。

供试培养基包括马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马铃薯葡萄糖培养液(PDB)、LB培养基(pH 7.0)、LA琼脂培养基(pH 7.0)、胰蛋白胨酵母浸膏氯化钠培养基(SOB)、胰蛋白胨酵母浸膏氯化钠葡萄糖培养基(SOC)培养基、诱导培养基IM(pH 4.9)以及共培养诱导培养基Co-IM。这些培养基成分及

配置方法参考范雷^[18]。以上所有培养基均在 121℃ 下灭菌 20 min。

1.2 遗传转化及相关因素优化

首先测定了菌株 Lb731 对潮霉素 B 的敏感性。将菌株 Lb731 接种至含有不同浓度潮霉素 B (2~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和不含潮霉素 B (对照) 的 PDA 平板上, 各处理重复 5 次。将培养物放在 22℃ 黑暗条件下培养 12 d, 测定各菌落直径。

参考农杆菌介导转化灰葡萄孢的方法^[18], 优化影响农杆菌转化菌株 Lb731 的因素。具体操作程序是: (1) 将农杆菌 (含有质粒 pTFCM) 接种在含利福平、链霉素和卡那霉素 (各 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LA 平板上培养 (28℃, 36 h); (2) 用灭菌牙签挑取单菌落, 接种至 10 mL 含有卡拉霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养液中, 28℃ 摇培 (160 r/min) 36 h; (3) 取 2 mL 细菌菌液, 接种至 25 mL IM 液体培养基中 (含有 FeSO_4 、乙酰丁香酮和 2-N-吗啉-乙基磺酸), 28℃ 摇培 (160 r/min) 8 h; (4) 将细菌菌液与 Lb731 分生孢子悬浮液 (2×10^7 个孢子/mL) 等体积混合, 取 100 μL 混合液, 涂布到 Co-IM 培养基表面的玻璃纸上, 25℃ 黑暗培养 72 h; (5) 将玻璃纸揭下, 将有菌丝的一面向上, 放置在培养皿中, 上面覆盖一层含有潮霉素 B (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和头孢肟塞钠 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 PDA 培养基; (6) 20℃ 培养 2~8 d, 挑取单菌落, 转移至含有潮霉素 B 的 PDA 平板上继续培养, 将能够生长的菌落初步定为转化子。

在此基础上, 从 4 个因素入手优化 ATMT 转化程序。第一个因素是转化受体 (分生孢子) 的培养时间。将菌株 Lb731 接种在 PDA 培养基上, 22℃ 黑暗培养 9、11、13、15、17、19、21 和 23 d, 取出各时间点培养物, 用无菌水洗下分生孢子, 配成孢子悬浮液 (2×10^7 孢子/mL), 并将其作为遗传转化的受体材料, 分别与农杆菌菌液等体积混合, 涂布在玻璃纸上, 25℃ 黑暗培养 72 h, 再用含潮霉素 B 的 PDA 平板覆盖玻璃纸, 20℃ 培养 6 d, 统计各平板 (直径 9 cm) 长出的转化子数量。第二个因素是转化受体浓度。将菌株 Lb731 在 22℃ 黑暗条件下培养 15 d, 用无菌水洗下分生孢子, 配制成孢子浓度为 2×10^5 、 2×10^6 、 2×10^7 和 2×10^8 孢子/mL 的悬浮液, 将其作为转化受体, 分别与农杆菌共培养 (25℃, 72 h)。随后在含有潮霉素 B 的 PDA 平板上培养, 统计各平板长出的转化子数量。第三个因素是共培养温度。将农杆菌菌液与菌株 Lb731 分生孢子悬浮液 (2×10^7 孢子/mL) 混合, 涂布在 Co-IM 培养基表面的玻璃纸

上, 分别置于 22℃、25℃ 和 28℃ 下培养 72 h。最后在含有潮霉素 B 的 PDA 平板上培养, 统计各平板上长出的转化子数量。第四个因素是共培养时间。将农杆菌与菌株 Lb731 分生孢子悬浮液 (2×10^7 孢子/mL) 混合, 涂布在玻璃纸上, 25℃ 下培养 36、48、60、72、84、96 和 108 h。分别在含有潮霉素 B 的 PDA 培养基上培养, 统计各平板上长出的转化子数量。上述试验中各处理重复 3 次, 将转化子菌丝保存在 20% 甘油中 (-80℃)。

1.3 T-DNA 插入体库质量评估

从 T-DNA 插入基因组频率、遗传稳定性以及 T-DNA 拷贝数等 3 个方面对 T-DNA 插入体库质量进行了评估。采用 PCR 方法测定 T-DNA 插入基因组的频率。随机选取 220 个转化子 (占 9.5%, $n = 2316$), 用 PDA 培养基培养各转化子 (22℃, 9 d), 收集菌丝。用 CTAB 法^[19] 从菌丝中提取 DNA, 将其作为 PCR 模板, 以质粒 pTFCM 为对照模板, 用特异性引物 HYG-F/HYG-R 扩增潮霉素基因 (表 1)。PCR 反应体系及运行程序参考范雷^[18]。最后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物中的 674 bp 特异性 DNA 条带。

为检测转化子遗传稳定性, 随机挑选 12 个转化子 (LbT-85、LbT-126、LbT-529、LbT-595、LbT-721、LbT-754、LbT-999、LbT-1256、LbT-1440、LbT-1598、LbT-1731、LbT-1854), 将其在不含潮霉素的 PDA 平板上连续转代培养 5 代 (长满平板为 1 代)。将各菌株的第 1 代和第 5 代菌丝分别接种至含有潮霉素 B (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 PDA 培养基上培养 (20℃), 从菌丝生长与否判断潮霉素抗性性状是否稳定遗传, 培养 15 d 后观察菌落形态, 判断菌落形态是否一致或相似。

采用 Southern 杂交的方法检测转化子中插入的 T-DNA 拷贝数。随机挑选 14 个转化子 (LbT-85、LbT-126、LbT-544、LbT-595、LbT-721、LbT-754、LbT-999、LbT-1256、LbT-1440、LbT-1598、LbT-1601、LbT-1731、LbT-1854、LbT-1960), 将菌株 Lb731 及转化子分别接种在 PDB 培养液中, 22℃ 振荡培养 4 d (150 r/min), 过滤收集菌丝。采用 CTAB 法^[19] 从菌丝中提取 DNA, 用限制性内切酶 *SacI* 酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段, 并将凝胶中的 DNA 片段转移至尼龙膜上。与此同时, 以质粒 pTFCM 为 DNA 模板, 采用特异性引物 (HYG-F/HYG-R) PCR 扩增潮霉素抗性基因 (*hph*) 部分片段, 回收, 配制成溶液 (10 ng/ μL)。按 Amersham Gene Images Alk-

phos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)试剂盒推荐的方法标记 *hph* 片段, 制备成探针。按《分子克隆实验指南》^[20]中的方法操作探针-DNA 片段杂交。最后采用免疫显色方法, 用碱性磷酸酶化学发光底物 CDP-Star 在化学发光成像系统中检测杂交信号。

1.4 突变体筛选及生物学特性测定

将菌株 Lb731 及 2316 个转化子分别接种在 PDA 平板上, 20℃ 黑暗培养 15 d, 观察菌丝生长情况、菌落颜色及分生孢子产生情况。筛选菌丝生长受抑制、色素产生缺陷以及分生孢子产生缺陷的转化子, 将其视为菌株 Lb731 的突变体。

在此基础上选择 15 个代表性突变体, 以 Lb731 为对照, 测定其菌丝生长速度及致病力。在测定菌丝生长速度时, 将突变体及菌株 Lb731 分别接种在 PDA 平板上, 20℃ 培养 4 d 和 8 d, 测定菌落直径, 计算菌丝生长速率 (mm/d), 重复 5 次。

用于测定致病力的甘蓝型油菜品种是大地 95。将其播种至植物栽培基质中, 在光照培养室中 (20℃, 12 h 光照/12 h 黑暗) 培养至第 3 片真叶完全展开。与此同时, 用 PDA 培养突变体和菌株 Lb731 (20℃, 8 d)。接种时, 用解剖针针尖在油菜植株第 3 片真叶主叶脉两侧轻轻刺伤叶片, 将供试菌株菌丝 (直径 5 mm 菌丝琼脂块) 接种至刺伤处, 每个菌株接种 3 株油菜。最后将油菜植株移至 16℃ 保湿箱中培

养 10 d, 测定接种点周围病斑直径, 接种试验重复 3 次。

1.5 T-DNA 插入位点侧翼序列的获得及分析

采用 hiTAIL-PCR (high-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR) 技术从突变体中获得 T-DNA 插入位点两侧的 DNA 序列^[21]。连续 3 轮 PCR 引物见表 1, 反应体系配制及 PCR 反应程序参考范雷^[18]和 Liu & Chen^[21]。用琼脂糖凝胶电泳检测最后一轮 PCR 产物, 纯化目标 DNA, 将其连接到载体 pMD18-T 质粒上, 随后将质粒导入大肠杆菌 Trans 5α 感受态细胞中, 在 LB 中培养过夜 (37℃), 检测质粒, 测序, 最后分析序列, 确定 T-DNA 插入位点。

1.6 统计分析

采用 SAS 软件 (SAS Institute, Cary, NC, USA, v. 8.0, 1999) 中的方差分析 (analysis of variance, ANOVA) 程序分析菌落直径、菌丝生长速度、转化子数目和病斑直径等指标。采用最小显著性差异检验法 (least significant difference, LSD) 分析不同潮霉素 B 处理或不同转化子 (突变体、菌株) 之间在上述指标方面的差异显著性 ($P < 0.05$)。

2 结果和分析

2.1 油菜黑胫病菌对潮霉素 B 的敏感性

在不含潮霉素 B 的 PDA 平板上, 菌株 Lb731 在 20℃ 下菌丝生长旺盛, 培养 7 d 后, 菌落直径达到

表 1 引物及其寡核苷酸序列

Table 1 Primers and their oligonucleotide sequences

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5' to 3')	用途 Purpose
HYG-F	GACAGCCTCTCCGACCTGA	检测潮霉素抗性基因, 探针
HYG-R	GCTCCATACAAGCCAACCAC	Detection of the <i>hph</i> gene as probe
LAD1-1	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCNVNNGGAA	hiTAIL-PCR (第一轮)
		hiTAIL-PCR (the first run)
LAD1-2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNBNNGGTT	hiTAIL-PCR (第一轮)
		hiTAIL-PCR (the first run)
LAD1-3	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVVNNGGCAA	hiTAIL-PCR (第一轮)
		hiTAIL-PCR (the first run)
LAD1-4	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBDBNNGGTT	hiTAIL-PCR (第一轮)
		hiTAIL-PCR (the first run)
AC-1	ACGATGGACTCCAGAG	hiTAIL-PCR (第一、二轮)
		hiTAIL-PCR (the first and second runs)
RB-0a	GGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGT	hiTAIL-PCR (第一轮)
		hiTAIL-PCR (the first run)
RB-1a	ACGATGGACTCCAGTCCGGCCTGTTGCCGGTCTTCCGATGATTATCA	hiTAIL-PCR (第二轮)
		hiTAIL-PCR (the second run)
RB-2a	GTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTT	hiTAIL-PCR (第三轮)
		hiTAIL-PCR (the third run)

Note: Source of primer [21]: Liu YG, and Chen YL. BioTechniques, 2007, 43(5):649-659.

78.8 mm(图1)。在含有 2 $\mu\text{g/mL}$ 和 4 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素 B 的 PDA 平板上,菌株 Lb731 菌丝生长受到明显抑制,菌落周围积累大量褐色色素,菌落直径分别是 16.4 和 8.5 mm。当潮霉素 B 浓度高于 6 $\mu\text{g/mL}$ 时,菌株 Lb731 停止生长。可见,潮霉素 B 抑制菌株 Lb731 最低浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$ 。为了减少假阳性转化子产生,本研究将筛选转化子所用潮霉素 B 浓度定为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

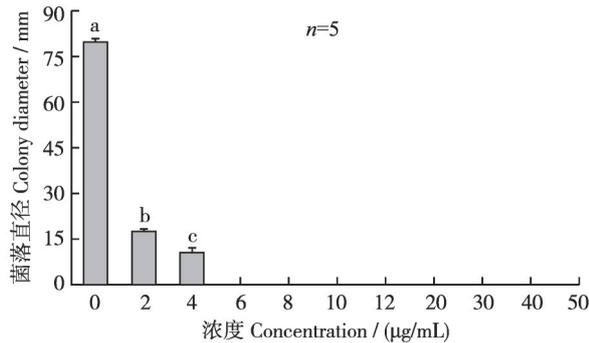


图1 油菜黑胫病菌 Lb731 菌丝生长对潮霉素 B 的敏感性 (PDA, 20 $^{\circ}\text{C}$, 7 d)

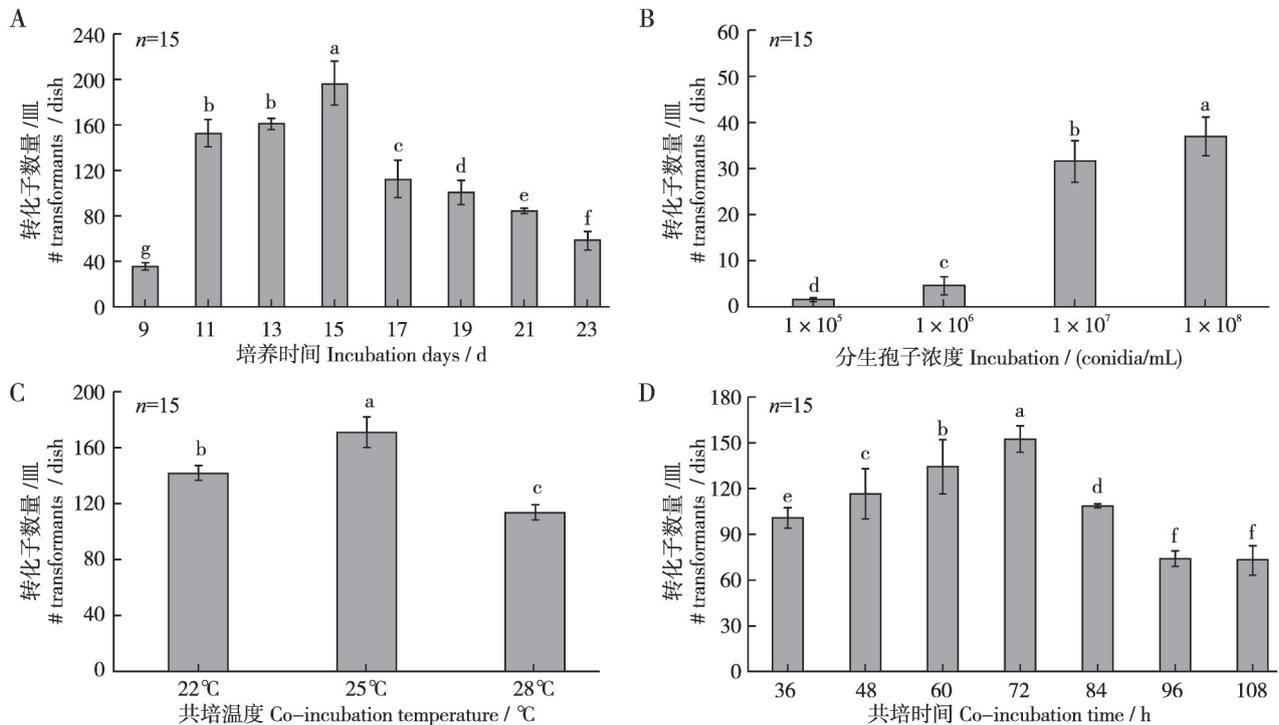
Fig. 1 Sensitivity of *L. biglobosa* Lb731 to hygromycin B for mycelial growth on potato dextrose agar (20 $^{\circ}\text{C}$, 7 d)

2.2 ATMT 转化油菜黑胫病菌的最佳条件

本研究中的 4 种因素对 ATMT 转化效率均有显著 ($P < 0.05$) 影响(图 2)。就分子孢子成熟度而言,从 15 d 菌落中收集的分生孢子产生的转化子最多,每皿转化子数量达到 192 个,显著 ($P < 0.05$) 高于从其它菌龄分生孢子中得到的转化子数量(37~160 个转化子/皿)。就分子孢子浓度而言,随着浓度从 2×10^5 个孢子/mL 上升至 2×10^8 个孢子/mL,每皿平均转化子数量从不足 2 个上升至 37 个,显然,高浓度转化受体对转化效率很重要。就共培养温度而言,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下,每皿平均产生 170 个转化子,显著高于 ($P < 0.05$) 在 22 $^{\circ}\text{C}$ 和 28 $^{\circ}\text{C}$ 下产生的转化子数量(分别为 140 和 115 个转化子/皿)。就共培养时间(25 $^{\circ}\text{C}$) 而言,当共培养 72 h 时,每皿转化子数量达到 150 个,显著高于 ($P < 0.05$) 其它处理(72~100 个转化子/皿)。因此,农杆菌转化菌株 Lb731 的最佳条件是:潮霉素 B 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$,转化受体为 15 d 菌落的分生孢子,浓度为 2×10^7 ~ 8 个孢子/mL,农杆菌-分生孢子共培养温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,共培养时间为 72 h。在此条件下,每百万分生孢子可获得 80 个转化子。

2.3 油菜黑胫病菌 T-DNA 插入体库的质量

采用 PCR 方法检测了 220 个转化子中 T-DNA



注:A:转化受体分生孢子培养时间;B:转化受体分生孢子浓度;C:农杆菌-受体共培养温度;D:农杆菌-受体共培养时间

Note: A: Incubation time for transformation recipients (conidia); B: Concentration of the transformation recipients; C: Co-incubation temperature for *A. tumefaciens*-*L. biglobosa*; D: Co-incubation time for *A. tumefaciens*-*L. biglobosa*

图2 农杆菌介导遗传转化油菜黑胫病菌的影响因素优化

Fig. 2 Optimization of the factors affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *L. biglobosa* Lb731

插入情况。结果表明:在所有转化子以及质粒 pTF-CM 中均能检测到大小为 674 bp 的 DNA 条带,即潮霉素抗性基因部分片段(图 3A),可见,转化子中 T-DNA 整合到基因组中的频率为 100%。

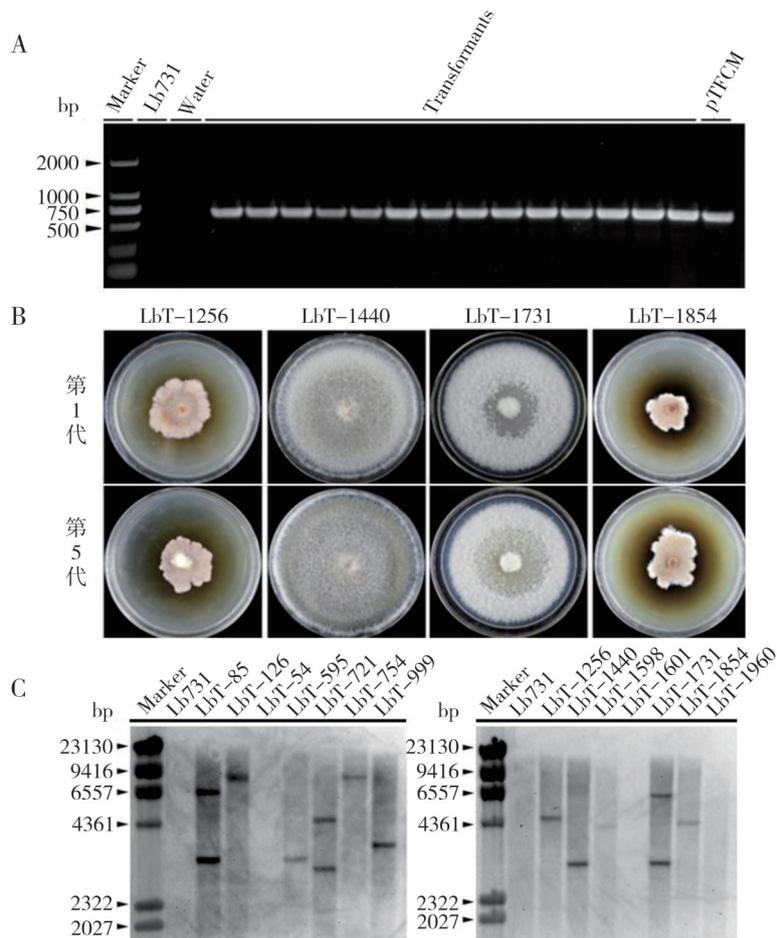
在没有潮霉素存在的 PDA 平板上将 12 个转化子连续培养 5 代,再将其接种在含有潮霉素 B (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 PDA 平板上培养 (20 $^{\circ}\text{C}$)。所有转化子后代均能生长,说明它们仍然拥有潮霉素抗性性状,潮霉素抗性基因在细胞核有丝分裂过程中没有丢失。培养 15 d 后,所有转化子第 5 代菌落形态与其第 1 代菌落形态相似(图 3B)。例如,转化子 LbT-1256 和 LbT-1854 的两代菌落均较小,且均大量产生褐色色素,而转化子 LbT-1440 和 LbT-1731 的两代菌落均较大,占领整个平板。可见,转化子的培养

性状是稳定的。

在 Southern 杂交试验中,野生型 Lb731 没有显示杂交信号,而 11 个转化子显示杂交信号(图 3C),3 个转化子没有显示杂交信号,可能原因是菌丝生长较慢,生物量较低,从中提取的 DNA 量不足。在 11 个有杂交信号的转化子中,8 个(占 72.7%)显示 1 条杂交带,说明它们是单拷贝插入,3 个(占 27.3%)显示 2 条杂交带,说明它们是双拷贝插入。

2.4 油菜黑胫病菌突变体筛选及生物学特性

通过比较转化子与野生菌株 Lb731 的菌落形态,从 2136 个转化子中筛选出 3 类 32 个突变体(表 2)。第一类为菌丝生长抑制型突变体,包括 11 个转化子,其中,10 个转化子大量产生褐色色素,8 个转化子不能产生分生孢子。第二类为色素产生缺陷



注:A:1%琼脂糖凝胶检测Lb731及其部分转化子中潮霉素抗性基因的导入频率;B:代表性转化子第1代和第5代菌落形态比较PDA+50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素B(20 $^{\circ}\text{C}$, 15 d);C:代表性转化子Southern杂交结果

Note: A: An electrophoregram showing the PCR-amplified DNA fragments of the hygromycin-resistance gene in the wild type Lb731 and 14 transformants; B: Comparison of the morphology of the first and the fifth generation of the representative transformants (PDA + hygromycin B at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $^{\circ}\text{C}$, 15 d); C: Southern blotting of the Sac I-digested DNA from Lb731 and representative transformants using the partial sequence of the hygromycin-resistance gene as probe

图3 油菜黑胫病菌Lb731的T-DNA插入体库的质量评价

Fig. 3 Quality evaluation of T-DNA-insertional library for *L. biglobosa* Lb731

型突变体,即不产生褐色色素,包括7个转化子,其中,5个转化子不能产生分生孢子。第三类为分生孢子产生缺陷型突变体,即不能产生分生孢子器和分生孢子,包括14个转化子,其中,7个转化子菌丝生长受到抑制,3个转化子大量产生褐色色素。此外,还获得了一个菌丝生长速率较Lb731快,且产孢正常的突变体,即LbT-1440。

选择15个代表性突变体,以Lb731为对照,测定菌丝生长速率及致病力。

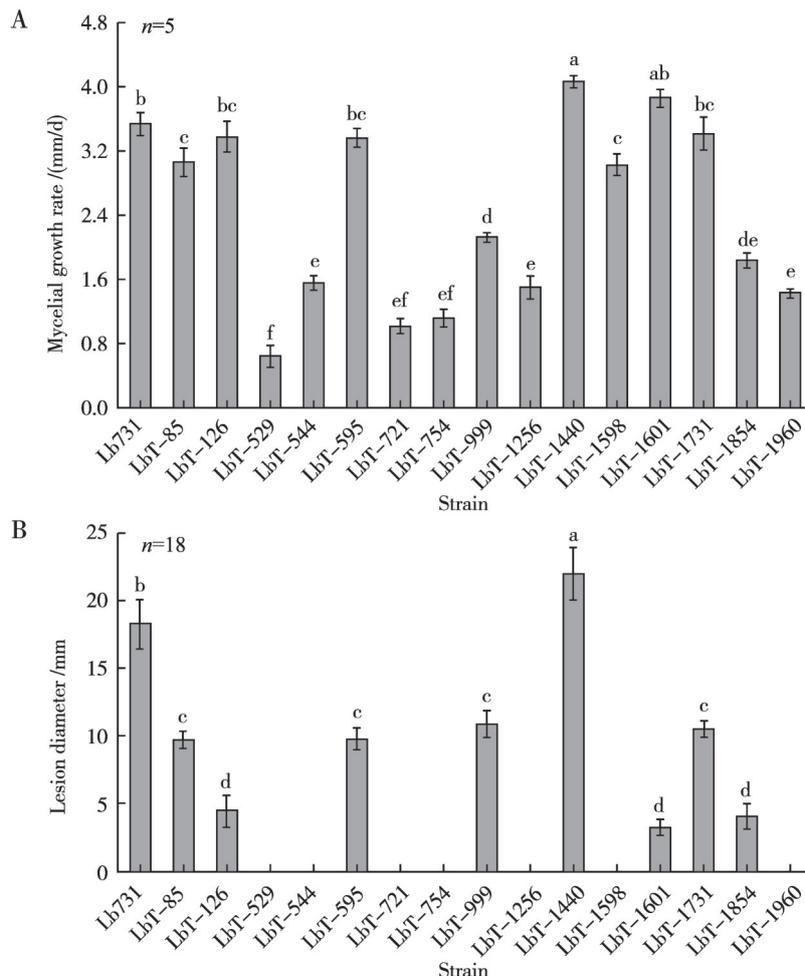
菌丝生长速率测定结果表明:在20℃下,Lb731菌丝生长速率为3.5 mm/d(图4A)。4个突变体(LbT-126、LbT-595、LbT-1601、LbT-1731)菌丝生长速率为3.3~3.9 mm/d,与Lb731没有显著差异($P > 0.05$)。转化子LbT-1440菌丝生长速率为4.1 mm/d,显著($P < 0.05$)高于Lb731的菌丝生长速率。其它10个突变体(LbT-85、LbT-529、LbT-544、LbT-721、LbT-754、LbT-999、LbT-1256、LbT-1598、LbT-

1854、LbT-1960)的菌丝生长速率为0.6~2.2 mm/d,显著($P < 0.05$)低于Lb731的菌丝生长速率。

致病力测定(16℃, 10 d)结果表明:供试16个菌株在油菜叶片上所致病斑直径差异显著($P < 0.05$)。菌株Lb731和LbT1440所致病斑直径最大,分别达到18.2 mm和21.9 mm(图4B),7个突变体(LbT-85、LbT-126、LbT-595、LbT-999、LbT-1601、LbT-1731、LbT-1854)造成的病斑直径为3.7~11.0 mm,与Lb731和LbT1440病斑直径存在显著差异($P < 0.05$),因而,它们属于致病力减弱突变体。其余7个突变体(LbT-529、LbT-544、LbT-721、LbT-754、LbT-1256、LbT-1598、LbT-1960)没有造成坏死斑,它们是致病力丧失突变体。

2.5 T-DNA 插入位点

利用hiTAIL-PCR扩增技术获得了3个突变体(LbT-126、LbT-754、LbT-1440)的T-DNA插入位点信息。结果表明:从中获得的T-DNA插入位点侧翼



注:A:菌丝生长速率(PDA, 20℃, 用第4 d和第8 d数值计算);B:病斑直径(16℃, 10 d)

Note: A: Mycelial growth rates on PDA at 20℃ by the diameters from the 4th- and the 8th-day; B: Leaf lesion diameters on oilseed rape (16℃, 10 d)

图4 油菜黑胫病菌野生菌株Lb731及代表性转化子(突变体)的菌丝生长速率和致病力

Fig. 4 Mycelial growth rates and pathogenicity of Lb731 and representative mutants

表2 油菜黑胫病菌突变体菌丝生长及菌落形态比较

Table 2 Comparison of mycelial growth and colony morphology among 35 mutants

突变体类型 Mutation type	突变体 Mutant	菌丝生长 Mycelial growth	色素产生 Pigment production	分生孢子产生 Conidial production
菌丝生长抑制型 Suppressed mycelial growth	LbT-411	—	+	—
	LbT-529	—	+	ND
	LbT-605	—	+	—
	LbT-667	—	+	ND
	LbT-671	—	+	ND
	LbT-1256	—	+	—
	LbT-1709	—	+	—
	LbT-1729	—	+	—
	LbT-1818	—	+	—
	LbT-1854	—	+	—
色素产生缺陷型 Deficiency in pigment production	LbT-1960	—	—	—
	LbT-126	ND	—	—
	LbT-574	ND	—	—
	LbT-595	ND	—	ND
	LbT-754	—	—	—
	LbT-1570	ND	—	—
	LbT-1731	ND	—	ND
分生孢子产生缺陷型 Deficiency in conidial production	LbT-2233	ND	—	—
	LbT-85	ND	+	—
	LbT-314	—	ND	—
	LbT-340	ND	ND	—
	LbT-392	ND	ND	—
	LbT-544	—	ND	—
	LbT-646	ND	+	—
	LbT-721	—	+	—
	LbT-894	ND	ND	—
	LbT-999	—	ND	—
	LbT-1208	—	ND	—
	LbT-1361	ND	ND	—
	LbT-1598	—	ND	—
	LbT-1601	+	ND	—
	LbT-2153	—	ND	—

注:—:较Lb731慢;+:较Lb731快;ND:没有测定

Note: +: Faster/more than Lb731; -: Slower/less than Lb731; ND: Not determined

序列与 *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae' b35 中的对应序列核苷酸一致性达到 97%~99%, 说明所获 DNA 序列来源于突变体。但是, 目前得不到菌株 b35 基因组的注释信息, 因而, 只能借助已经注释的 *L. maculans* JN3 基因组信息分析 T-DNA 插入位点。从 LbT-126 中获得的序列与 *L. biglobosa* 'brassicae' b35_scaffold00043 序列一致性为 99%。该序列与 *L. maculans* JN3 的一个假定蛋白编码基因 (GenBank Acc. No. LEMA_P032900.1) 一致性为 56%。由此可推定在这一突变体中, T-DNA 插入破坏的基因编码一个假定蛋白 (图 5)。从 LbT-754 中获得的

DNA 序列与 *L. biglobosa* 'brassicae' b35_scaffold00001 核苷酸一致性为 97%。该基因与 *L. maculans* JN3 的 MAP kinase kinase (Mkk2) (GenBank Acc. No. LEMA_P017630.1) 基因序列一致性达到 79%。由此推定 T-DNA 插入在 *Mkk2* 基因上 (图 5)。从 LbT-1440 中获得的侧翼序列与 *L. biglobosa* 'brassicae' b35_scaffold00003 complete sequence 核苷酸一致性为 99%。该位点位于一个基因上游区域。对该基因序列与 *L. maculans* JN3 类荚膜相关蛋白 CAP1 基因 (GenBank Acc. No. LEMA_P011670.1) 序列一致性为 94%。

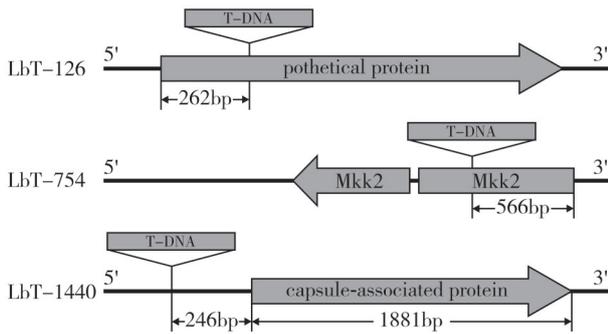


图5 三个转化子T-DNA插入位点示意图及其侧翼序列分析
Fig. 5 Schematic diagram of T-DNA insertion sites and flanking sequences in the 3 mutants

3 讨论

本研究构建并优化了根癌农杆菌介导转化油菜黑胫病菌(*L. biglobosa*)菌株Lb731的技术体系,明确了转化受体(分生孢子)成熟度及浓度以及农杆菌-受体共培养温度及时间等因素对ATMT转化效率的影响,为构建*L. biglobosa*突变体库创造了条件。如前所述,*L. biglobosa*在全球油菜产区广泛发生^[2,4,22]。这一事实说明*L. biglobosa*具有较强的生态适应性。然而,对*L. biglobosa*的生态适应性机制以及致病机制研究较少^[23]。主要原因是:在欧美及澳大利亚等油菜产区,*L. maculans*和*L. biglobosa*共存^[21],*L. maculans*致病性强,危害重,而*L. biglobosa*致病性较弱,危害较轻。因而,这些地区的学者将研究重点放在*L. maculans*上,而*L. biglobosa*则往往不被重视。但是,我国仅存在*L. biglobosa*^[4-9],对这一病原及所致病害的研究起步晚^[3]。由于长期受*L. biglobosa*致病性弱这一观念的影响,我国不少学者认为没有必要对*L. biglobosa*开展深入研究。但是,我国的气候特征以及油菜栽培模式与欧美和澳大利亚等国家不完全相同,最近的两项独立研究结果表明:*L. biglobosa*在我国一些地区造成油菜籽减产10%~50%^[8-10],在局部地区,*L. biglobosa*发生程度甚至超过了油菜菌核病^[4]。这些事实说明*L. biglobosa*在我国局部地区发生危害不可小视,有必要深入研究其生态适应性机制和致病机制。本研究从2136个转化子中筛选出7个致病性丧失突变体,为解析*L. biglobosa*的致病机制提供了基础研究材料。

Lowe等^[24]通过基因组学和转录组学分析发现:*L. maculans*和*L. biglobosa*侵染寄主植物以及从寄主组织中获得营养的方式不同,前者以半活体营养方式从寄主中攫取营养物质,而后者则以死体营养方式从寄主中攫取营养物质。这与我们在田间观

察的症状相吻合,*L. biglobosa*多从伤口处(冻伤、虫害、叶痕)和花器中的柱头侵入油菜组织,进而形成坏死斑^[21]。前人对灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)和核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)等典型死体营养型致病菌的研究结果表明:菌丝生长速率影响其侵染植物的侵袭力以及对植物造成的破坏程度,菌丝生长快,则侵袭力强,对寄主植物破坏严重^[22,24]。本研究测定了15个突变体的致病力,发现其菌丝生长速率与叶片坏死斑直径有一定关系。菌丝生长快的突变体(如LbT-1440)造成的病斑直径大,而菌丝生长慢的突变体(如LbT-529、LbT-544、LbT-721、LbT-754、LbT-1256、LbT-1854、LbT-1960)造成的病斑直径较小,甚至不造成坏死斑。这一结果反映出*L. biglobosa*具有与灰葡萄孢和核盘菌等死体营养型病原菌相似的特征。Lowe等^[24]还发现:*L. biglobosa*在寄生过程中大量分泌水解酶,参与分解寄主细胞壁以及细胞质中的大分子物质,以获取菌丝生长以及无性繁殖所需的营养物质。在灰葡萄孢和核盘菌致病过程中,除分泌大量的细胞壁降解酶之外,还产生毒素^[25,26],灰葡萄孢产生botrydials^[27],核盘菌产生草酸^[28]。前人的研究表明:*L. maculans*产生sirodesmin PL,而*L. biglobosa*则不能产生这类毒素^[29],因而,*L. biglobosa*毒害寄主细胞的机制可能不同于*L. maculans*,值得深入研究。

次生代谢产物(如毒素、抗菌物质、色素等)在真菌适应周围环境中扮演重要角色^[27,30]。当受到拮抗性芽孢杆菌抑制时,*L. biglobosa*大量分泌褐色色素^[31]。本研究发现:当*L. biglobosa*菌丝生长受到抑制潮霉素B(2~4 μg/mL)抑制时,*L. biglobosa*大量分泌褐色色素。此外还发现了10个菌丝生长抑制型突变体大量分泌褐色色素(表2)。这些结果说明:*L. biglobosa*分泌褐色色素与其抵抗逆境有关系。本研究获得了8个不能分泌褐色色素的突变体,对于揭示褐色色素生物合成的分子机制及其生态适应性功能有一定的价值。

前人建立了克隆T-DNA插入位点侧翼序列的hiTAIL-PCR^[21]。本研究采用这一技术,从3个突变体(LbT-126、LbT-754、LbT-1440)中获得了T-DNA插入位点侧翼序列。在突变体LbT-126中,T-DNA插入破坏了一个功能位置的蛋白,与之相关的表型包括色素合成缺陷,不能产生分生孢子,致病力减弱。在突变体LbT-754中,T-DNA插入破坏了Mkk2基因,与之相关的性状包括色素合成缺陷,不能产生分生孢子,以及致病力完全丧失。在突变体

LbT-1440 中, T-DNA 插入在 CAP1 基因上游非编码区, 该突变体菌丝生长正常, 产孢正常, 致病力与野生型 Lb731 没有差异 (或略强于 Lb731)。通过熟化了 hiTAIL-PCR 技术, 为获得更多相关基因序列奠定了技术基础。

总之, 本研究优化了影响农杆菌介导转化 *L. biglobosa* 的因素, 由此建立了 *L. biglobosa* 的 ATMT 技术体系。T-DNA 插入频率达到 100%, 单拷贝插入频率达到 72.7%, 且遗传稳定。从 2136 个转化子中获得 32 个突变体, 包括 11 个菌丝生长减缓突变体、7 个色素产生缺陷突变体和 14 个分生孢子产生缺陷突变体, 并从中鉴定出 7 个致病力减弱突变体和 7 个致病力丧失突变体。采用 hiTAIL-PCR 技术获得了 3 个突变体的 T-DNA 插入位点侧翼序列。

参考文献:

- [1] West J S, Kharbanda P D, Barbetti M J, et al. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (Phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe [J]. *Plant Pathol*, 2001, 50 (1): 10-27. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2001.00546.x.
- [2] Fitt B D L, Brun H, Barbetti M J, et al. World-wide importance of *Phoma* stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*) [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2006, 114(1): 3-15. DOI: 10.1007/s10658-005-2233-5.
- [3] West J S, Evans N, Liu S, et al. *Leptosphaeria maculans* causing stem canker of oilseed rape in China [J]. *Plant Pathol*, 2000, 49 (6): 800. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2000.00503.x.
- [4] 李强生, 荣松柏, 胡宝成, 等. 中国油菜黑胫病害分布及病原菌鉴定 [J]. *中国油料作物学报*, 2013, 35 (4): 415-423. DOI: 10.7505/j.issn.1007-9084.2013.04.011.
- [5] 宋培玲, 吴晶, 史志丹, 等. 油菜黑胫病的病原、病害循环及其传播危害 [J]. *北方农业学报*, 2018, 46(2): 88-93. DOI: 10.3969/j.issn.2096-1197.2018.02.18.
- [6] 郝丽芬, 宋培玲, 李子钦, 等. ISSR 标记分析油菜黑胫病原菌遗传多样性 [J]. *中国油料作物学报*, 2014, 36 (1): 98-105. DOI: 10.7505/j.issn.1007-9084.2014.01.015.
- [7] Liu Z, Latunde-Dada A O, Hall A M, et al. *Phoma* stem canker disease on oilseed rape (*Brassica napus*) in China is caused by *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae' [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2014, 140(4): 841-857. DOI: 10.1007/s10658-014-0513-7.
- [8] Cai X, Zhang J, Wu M D, et al. Effect of water flooding on survival of *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae' in stubble of oilseed rape (*Brassica napus*) in central China [J]. *Plant Dis*, 2015, 99 (10): 1426-1433. DOI: 10.1094/pdis-10-14-1042-re.
- [9] Cai X, Huang Y J, Jiang D H, et al. Evaluation of oilseed rape seed yield losses caused by *Leptosphaeria biglobosa* in central China [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2018, 150(1): 179-190. DOI: 10.1007/s10658-017-1266-x.
- [10] 荣松柏, 胡宝成, 陈凤祥, 等. 油菜黑胫病对油菜产量及农艺性状的影响 [J]. *作物杂志*, 2015(6): 159-161, 167. DOI: 10.16035/j.issn.1001-7283.2015.06.029.
- [11] Rouxel T, Balesdent M H. The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era [J]. *Mol Plant Pathol*, 2005, 6 (3): 225-241. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2005.00282.x.
- [12] Grandaubert J, Lowe R G, Soyer J L, et al. Transposable element-assisted evolution and adaptation to host plant within the *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex of fungal pathogens [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 891. DOI: 10.1186/1471-2164-15-891.
- [13] 荣松柏, 李强生, 初明光. 油菜黑胫病病原菌致病力差异分析 [J]. *安徽农业科学*, 2019, 47(21): 136-138, 159. DOI: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.21.040.
- [14] Bundock P, den Dulk-Ras A, Beijersbergen A, et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *EMBO J*, 1995, 14 (13): 3206-3214. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07323.x.
- [15] Michielse C B, Hooykaas P J, van den Hondel C A, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi [J]. *Curr Genet*, 2005, 48 (1): 1-17. DOI: 10.1007/s00294-005-0578-0.
- [16] Eckert M, Maguire K, Urban M, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene *DsRed* and the jellyfish gene *gfp* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 253(1): 67-74. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.09.041.
- [17] Blaise F, Rémy E, Meyer M, et al. A critical assessment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for pathogenicity gene discovery in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* [J]. *Fungal Genet Biol*, 2007, 44 (2): 123-138. DOI: 10.1016/j.fgb.2006.07.006.
- [18] 范雷. 灰葡萄孢 T-DNA 插入突变体库的构建及其致病相关基因研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [19] Möller E M, Bahnweg G, Sandermann H, et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues [J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20

- (22): 6115–6116. DOI:10.1093/nar/20.22.6115.
- [20] M.R. 格林, J. 萨姆布鲁克, 贺福初主译. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2017.
- [21] Liu Y G, Chen Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. *BioTechniques*, 2007, 43(5): 649–656. DOI:10.2144/000112601.
- [22] Fitt B D L, Huang Y J, van den Bosch F, et al. Coexistence of related pathogen species on arable crops in space and time[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2006, 44: 163–182. DOI:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143417.
- [23] 杨龙, 吴明德, 张静, 等. 油菜黑胫病研究进展[J]. *中国油料作物学报*, 2018, 40(5): 730–736. DOI:10.7505/j.issn.1007-9084.2018.05.016.
- [24] Lowe R G T, Cassin A, Grandaubert J, et al. Genomes and transcriptomes of partners in plant-fungal- interactions between canola (*Brassica napus*) and two *Leptosphaeria* species[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103098. DOI:10.1371/journal.pone.0103098.
- [25] Bolton M D, Thomma B P H J, Nelson B D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen[J]. *Mol Plant Pathol*, 2006, 7(1): 1–16. DOI:10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x.
- [26] Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease[J]. *Mol Plant Pathol*, 2007, 8(5): 561–580. DOI:10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x.
- [27] Choquer M, Fournier E, Kunz C, et al. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 277(1): 1–10. DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.00930.x.
- [28] Godoy G, Steadman J R, Dickman M B, et al. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris* [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1990, 37(3): 179–191. DOI:10.1016/0885-5765(90)90010-U.
- [29] Badawy H M A, Hoppe H H, Koch E. Differential reactions between the genus *Brassica* and aggressive single spore isolates of *Leptosphaeria maculans* [J]. *J Phytopathol*, 1991, 131(2): 109–119. DOI:10.1111/j.1439-0434.1991.tb04737.x.
- [30] Keller N P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3): 167–180. DOI:10.1038/s41579-018-0121-1.
- [31] 王梅菊, 刘晨, 吴明德, 等. 油菜内生细菌多样性分析及菌株 CanL-30 生防潜力评估[J]. *中国油料作物学报*, 2018, 40(2): 258–268. DOI:10.7505/j.issn.1007-9084.2018.02.012.

(责任编辑:郭学兰)