

棉花枯萎病菌突变体库的构建及分析

刘叶^{#1,2,3}, 顾爱星^{#*1,2,3}, 朱琦⁴

1 新疆农业大学农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

2 农林有害生物监测与安全防控重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052

3 新疆农业大学农学院/棉花教育部工程研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830052

4 新疆农业科学院核技术生物技术研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091

刘叶, 顾爱星, 朱琦. 棉花枯萎病菌突变体库的构建及分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 125-138

Liu Ye, Gu Aixing, Zhu Qi. Construction and analysis of mutant library of cotton *Fusarium wilt*[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 125-138

摘要:【背景】棉花枯萎病逐渐成为威胁新疆海岛棉产业发展的主要病害, 但关于棉花枯萎病菌的致病力、产孢量、生长速度及颜色变化等相关功能基因目前还不是十分明确。【目的】通过构建绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记棉花枯萎病菌突变体库, 筛选出由于 T-DNA 的随机插入而导致性状发生变异的突变体, 为棉花枯萎病菌功能基因筛选和研究提供材料。【方法】通过 *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT) 构建了 GFP 标记的棉花枯萎病菌的突变体库, 检测分析 T-DNA 插入情况及转化子稳定性, 对随机选取的突变体菌落形态、生长速率、产孢量、萌发率、T-DNA 插入拷贝数及致病力进行分析, 从而筛选获得变异明显且稳定的突变体。【结果】利用优化后的 ATMT 介导体系转化获得了 1 600 株 GFP 标记的棉花枯萎病菌转化子; 转化子在不含潮霉素 B 的 PDA 培养基上连续转接 7 代再转到含潮霉素 B 的培养基上仍能正常生长, 说明潮霉素 *Hyg* 基因成功插入野生型基因组且稳定遗传。最终筛选出 17 株菌落表型与野生型有差异的突变体, 其中包括生长缓慢型、菌丝深紫色型、菌丝淡紫色型、菌丝浅黄色型; 突变体 A-1 致病力相较于野生型增加了 21.98%, A-1 产孢量相较于野生型增加了 103.54%, C-6、C-7 产孢量相较于野生型降低 61.90%。【结论】构建了农杆菌介导 GFP 标记的棉花枯萎病菌突变体库, 筛选分析获得了菌落形态、生长速率、产孢量和致病力发生变化的突变体, 为进一步研究棉花枯萎病菌相关功能基因筛选奠定了基础。

基金项目: 新疆维吾尔自治区博士后科研流动站资助; 西北干旱区转基因耐旱耐盐碱棉花新品种培育项目 (2018ZX0800501B-001)

[#]对本文贡献相同

Supported by: Postdoctoral Research Flow Station of Xinjiang Uygur Autonomous Region; Project for Cultivation of New Transgenic Drought Tolerance and Saline Tolerance Cotton Varieties in Northwest Arid Area of China (2018ZX0800501B-001)

[#]These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: 594903711@qq.com

Received: 2021-04-12; Accepted: 2021-06-01; Published online: 2021-09-24

关键词：棉花；棉花枯萎病菌；ATMT；突变体库；绿色荧光蛋白

Construction and analysis of mutant library of cotton *Fusarium* wilt

LIU Ye^{#1,2,3}, GU Aixing^{#*1,2,3}, ZHU Qi⁴

1 College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

2 Key Laboratory of the Pest Monitoring and Safety Control of Crops and Forests, Urumqi 830052, Xinjiang, China

3 Engineering Research Centre of Cotton, Ministry of Education; College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

4 Institute of Nuclear Technology and Biotechnology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang, China

Abstract: [Background] Cotton *Fusarium* wilt has gradually become a major disease threatening the development of *Gossypium barbadense* cotton industry, but the related functional genes of cotton *Fusarium* wilt are not very clear. [Objective] In this study, a mutant library of *F. oxysporum* marked by green fluorescent protein (GFP) was constructed to screen mutants with random insertion of T-DNA, which could provide materials for the screening and research of functional genes of *F. oxysporum*. library of *F. oxysporum* marked by GFP was constructed. [Methods] The mutant library of GFP-labeled *F. oxysporum* was constructed by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT), and the T-DNA insertion and transformation stability were detected and analyzed. The colony morphology, growth rate, sporulation, germination rate, T-DNA insertion copy number and pathogenicity of randomly selected mutants were analyzed, so as to screen mutants with obvious variation and stability. [Results] 1 600 GFP-labeled *F. oxysporum* transformants were obtained by using the optimized ATMT mediated system. The transformants were transferred to PDA medium without hygromycin B for 7 generations and then transferred to the medium with hygromycin B. The transformants could still grow normally, indicating that hygromycin gene *Hyg* was successfully inserted into the wild-type genome and stably inherited. Finally, 17 mutants with different colony phenotypes were screened, including slow growth type, dark purple mycelium type, light purple mycelium type, and light yellow mycelium type. Compared with the wild type, the pathogenicity of mutant A-1 increased by 21.98%, the sporulation of mutant A-1 increased by 103.54%, and the sporulation of mutant C-6 and C-7 decreased by 61.90%. [Conclusion] The mutant library of cotton *Fusarium* wilt marked by GFP mediated by *Agrobacterium* was constructed, and the mutants with changes in colony morphology, growth rate, sporulation and pathogenicity were screened and analyzed, which laid a foundation for further study of functional genes related to cotton *fusarium* wilt.

Keywords: cotton; *Fusarium oxysporum*; ATMT; mutant library; green fluorescent protein

棉花枯萎病是一种植物维管束病害, 严重威胁海岛棉的生产^[1-2]。陈其焜等^[3]对我国棉花枯萎镰刀菌种进行了系统研究, 鉴定我国的棉花枯萎

病菌(*Fusarium oxysporum*)为尖孢镰刀菌(萎蔫专化型), 属于半知菌亚门丛梗孢目镰刀菌属。为了防治棉花枯萎病, 有必要对该病原菌的致病机

理进行研究,若要详细揭示棉花枯萎病菌的致病机理,首先需要分离和鉴定棉花枯萎病菌致病相关的基因,通过对这些致病基因的功能分析和研究才可能发现其分子病理学规律,使该基因发生突变并分析和发现由此引起的菌株表型和生理上的变化就是研究这些基因功能最常用的方法之一^[4-5]。由于 T-DNA 携带的核苷酸序列能随机插入到寄主基因组 DNA 上,因此可以获得大量的病原真菌转化子,这些转化子在致病水平上会表现出差异,通过与野生型病原菌水平比较,能够鉴定出致病力下降的转化子^[6-7]。王凯等为了研究马铃薯黄萎病菌的侵染机制,将 *GFP* 基因通过农杆菌介导的遗传转化方法转入马铃薯黄萎病菌 VD012 中,对获得的转化子的菌落形态、菌丝的生长速率、产孢量、粗毒素含量和致病力等进行了研究^[5]。李思蒙等将 *GFP* 基因整合到杨树炭疽病菌中,通过荧光显微镜观察到转化子发出绿色荧光,而且转化子的潮霉素 B 抗性和 *GFP* 表达性状可以稳定遗传^[6]。

本研究以野生型菌株 st89 为对照,对优化后获得的 1 600 多株中随机选取的 232 株突变体的菌落形态、生长速率、产孢量、萌发率、T-DNA 插入拷贝数和致病力进行分析,从而筛选获得变异明显且稳定的突变体,以期为棉花枯萎病菌功能基因的筛选、分离及克隆提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和质粒

棉花枯萎病菌是本实验室保存的中等致病力的 7 号生理小种 st89; 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、农杆菌感受态细胞 LBA4404 均购自北京金全生物技术有限公司; 二元质粒载体 pCH-sGFP 由江苏省农业科学院植物保护研究所刘延利老师惠赠,该质粒载体以构巢曲霉

(*Aspergillus nidulans*) TtrpC 作为启动子,绿色荧光蛋白 GFP 作为报告标记基因,潮霉素 B *Hyg* 作为筛选的标记基因。

1.1.2 主要试剂和仪器

潮霉素 B、乙酰丁香酮、头孢噻肟钠、利福平(Rif)、卡那霉素(Kan)、E.Z.N.A.真菌 DNA 提取试剂盒, Solarbio 公司。4-吗啉乙磺酸(4-morpholineethanesulfonic acid, MES), 福瑞克公司; 2 \times San Taq PCR Mix (含蓝染液)预混液、DNA 分子量标准 Marker、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; PCR DIG Probe Synthesis Kit、地高辛杂交检测试剂盒 II (化学发光法)、RNA Molecular Weight Marker I, Roche 公司; HyBond N⁺正电荷尼龙膜, Amersham 公司; 引物由华大基因公司合成。

倒置荧光显微镜, 北京冠普佳科技有限公司; 体视显微镜, Leica 公司。

1.1.3 培养基

培养基的配制参照文献[8]。

PDA 培养基用于真菌的培养; LB 培养基用于农杆菌和大肠杆菌的常规培养和保存。

IM 诱导培养基(g/L): K₂HPO₄·3H₂O 3.44, KH₂PO₄ 1.45, NaCl 0.15, MgSO₄·7H₂O 0.50, (NH₄)₂SO₄ 0.50, CaCl₂·2H₂O 0.067, FeSO₄·7H₂O 0.002 5, 葡萄糖 1.80, 吗啉乙磺酸 7.80, 甘油 5 mL。pH 5.4, 用于遗传转化中的共培养。

CM 培养基:在 IM 诱导培养基中加入 15 g/L 琼脂,用于诱导农杆菌侵染棉花枯萎病菌。

1.2 方法

本实验室前期对农杆菌介导棉花枯萎病菌的转化体系进行了优化,获得了转化的最佳体系,利用优化后的条件构建了棉花枯萎病菌突变体库,含有 1 600 多株突变体。现对随机挑选的 232 株突变体的遗传稳定性、生长速度、产

孢量和致病性等进行测定,以获得发生变异的突变体。

1.2.1 棉花枯萎病突变体库的构建

农杆菌的转化及培养:质粒 pCH-sGFP 采用冻融法转化到农杆菌 LBA4404 中。挑取农杆菌单菌落于 LB 液体培养基中(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rif), 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养过夜。12 h 后取 1.5 mL 菌液, 12 000 r/min 离心 2 min, 去上清, 用 IM 诱导培养基(含 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Acetosyringone, AS)清洗 2 次, 再用适量 IM 诱导培养基(含 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AS)悬浮菌体, 使之稀释至 OD_{600} 约为 0.2, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 继续振荡培养 8 h, 备用。

棉花枯萎病孢子悬浮液的制备:将野生型棉花枯萎病菌株 st89 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d, 用适量灭菌蒸馏水冲洗菌株得到孢子悬液, 血球计数板计数, 用无菌水稀释调整至孢子浓度为 1×10^5 个/mL 后备用。

农杆菌介导棉花枯萎病菌遗传转化:将准备好的农杆菌和孢子悬浮液分别取 100 μL 等体积混合均匀;将孔径为 0.45 μm 、直径为 50 mm 的微孔滤膜平铺到 CM(含 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AS)平板上;取 200 μL 混合液均匀涂布在微孔滤膜上, 26 $^{\circ}\text{C}$ 共培养 4 d 后将微孔滤膜取下, 用 500 μL 无菌水冲洗收集共培养物, 然后将共培养物涂布于初筛培养基 PDA(含有 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的潮霉素 B 及适宜浓度的头孢)上, 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养后长出的菌落初步确定为转化子, 用少量无菌水将初筛 PDA 培养基上的转化子冲洗下来, 将菌液涂布于复筛培养基(含有 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的潮霉素 B)上, 能顺利长出的转化子计算为阳性转化子。

1.2.2 转化子的 PCR 检测和荧光观察

为了进一步验证阳性转化子, 以沸水浴法^[9]快速获得转化子的 PCR 模板 DNA: (1) 用无菌牙签挑取少量转化子的菌丝置于 100 μL

的 NaOH 溶液(50 mmol/L)的离心管中, 将离心管放置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅沸水浴 10 min。(2) 沸水浴后加入 1/10 体积分约 10 μL 的 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)。(3) 经过 12 000 r/min 离心 2 min 后, 吸取 2 μL 上清作为 PCR 的 DNA 模板。

PCR 引物序列如下:

GFP-F: 5'-GACGTAAACGGCCACAAGTT-3';

GFP-R: 5'-GAACTCCAGCAGGACCATGT-3';

Hyg-F: 5'-GATGTAGGAGGGCGTGGATA-3';

Hyg-R: 5'-CTCTGATAGAGTTGGTCAAG-3'。

PCR 反应体系(25 μL): GFP 及 Hyg 引物 F/R (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 1 μL , 2 \times San Taq PCR Mix 12.5 μL , DNA 模板 1 μL , ddH₂O 9.5 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 退火温度(GFP 引物退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$, Hyg 引物退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$) 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

取鉴定为阳性转化子的菌丝和分生孢子样品制作临时玻片, 在倒置荧光显微镜下观察是否有绿色荧光。

1.2.3 阳性转化子潮霉素 B 抗性稳定性检测

随机挑取经 PCR 鉴定为阳性且能发出绿色荧光的阳性转化子, 接种于未添加潮霉素 B 的 PDA 培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。然后连续转接 7 次后再转接到含有潮霉素 B 的 PDA 培养基上生长, 观察其菌落形态, 明确转化子潮霉素 B 抗性的稳定性。

1.2.4 突变体形态观察

以野生型菌株 st89 为对照, 将供试的 232 株突变体分别在添加潮霉素 B 及不添加潮霉素 B 的 PDA 平板上 26 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 7 d, 观察记录各菌株的菌落形状、颜色和菌丝的生长情况。每个菌株设 3 个重复。

1.2.5 突变体生长速度和产孢量的测定

将野生型菌株 st89 和随机选择的 30 株突变体分别接种于 PDA 平板, 在 26 °C 恒温培养箱中培养 7 d; 采用打孔器在菌落相同位置打取菌饼, 菌饼直径约为 4 mm, 转接至 PDA 培养基, 26 °C 恒温培养。采用十字交叉法每日测量菌落直径, 每个菌株设 3 个重复。

将野生型菌株 st89 和随机选择的 30 株突变体分别接种于 PDA 培养基, 在 26 °C 恒温培养箱中培养 7 d; 采用打孔器在菌落相同位置打取菌饼, 菌饼直径约为 4 mm, 转接至 50 mL 查氏液体培养基中, 26 °C、220 r/min 恒温培养 6 d, 用血球计数板计算不同突变体产生分生孢子的数量, 每个菌株设 3 个重复。

1.2.6 pH 对突变体生长速度的影响

将野生型菌株 st89 和随机选择的 6 株突变体分别接种于 PDA 培养基, 在 26 °C 恒温培养箱中培养 7 d 后, 用打孔器在每个突变体菌落相同位置打取菌饼, 菌饼直径约为 4 mm, 转接至不同 pH 值的 PDA 培养基, pH 值分别为 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 26 °C 培养 5 d, 采用十字交叉法每日测量菌落的直径。每个菌株设 3 个重复。

1.2.7 突变体致病性测定

选择实验室前期筛选出的感病海岛棉材料 10876 作为供试棉花品种。

将野生型菌株 st89 和随机选择的 30 个突变体菌株分别接种于 PDA 培养基, 在 26 °C 恒温培养箱中培养 7 d 后, 采用打孔器在菌落相同位置打取菌饼, 直径约为 4 mm, 挑取 5–6 块放置于查氏液体培养基中, 置于 26 °C、220 r/min 恒温振荡培养箱中培养 7 d。用 4 层纱布过滤, 血球计数板将孢子浓度调至 1×10^6 个/mL。

选取饱满健康的棉种进行表面灭菌后用无菌水冲洗 3–4 次, 将种子置于无菌水中 26 °C 恒温培养 1–2 d 进行催芽, 将萌发后的种子均匀播

种在直径约为 10 cm 的营养钵里, 每钵 3 颗, 每个菌株接种 5 盆, 1 组清水对照。待长出两片真叶后用竹签伤根后每钵接种 30 mL 孢子悬浮液, 每周接种一次, 连续接种 2 周。常规管理, 待接种 30 d 后进行抗性鉴定, 为减小实验误差, 本实验重复 3 次。

1.2.8 T-DNA 插入拷贝数分析

真菌基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法, 并参考刘丹等^[10]的报道。

利用 Southern 杂交验证突变体的 T-DNA 插入拷贝数, 重组质粒和野生型菌株分别作为阳性对照和阴性对照。PCR 法探针标记的具体过程参照地高辛标记探针合成试剂盒, Southern 杂交实验方法参照《分子克隆实验指南》^[11]及地高辛杂交检测试剂盒 II 说明书进行。

2 结果与分析

2.1 优化后获得转化子的分子鉴定

前期优化后共获得 1 600 多株转化子, 随机挑选 245 个转化子进行荧光显微镜观察, 发现共有 13 个转化子在蓝色激发光下未产生绿色的荧光, 其假阳性率为 5.3%, 随机挑选 8 株进行 PCR 鉴定。由图 1 可知, 8 株转化子均可扩增出 GFP 目标片段(712 bp)及潮霉素 B 目标片段(750 bp)。

2.2 转化子遗传稳定性分析及荧光观察

为了鉴定转化子的遗传稳定性, 在无潮霉素 B 抗性的 PDA 培养基中连续继代培养 7 代, 转接到含有 150 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素 B 的 PDA 培养基中, 观察菌丝生长情况及 GFP 基因表达情况。结果表明, 连续继代培养 7 代后, 转化子均能正常生长, 野生型 st89 停止生长。借助倒置荧光显微镜对 3 个转化子的荧光信号进行了检测, 图 2 显示均能产生绿色荧光信号, 但在野生型 st89 菌株中未观察到任何荧光。

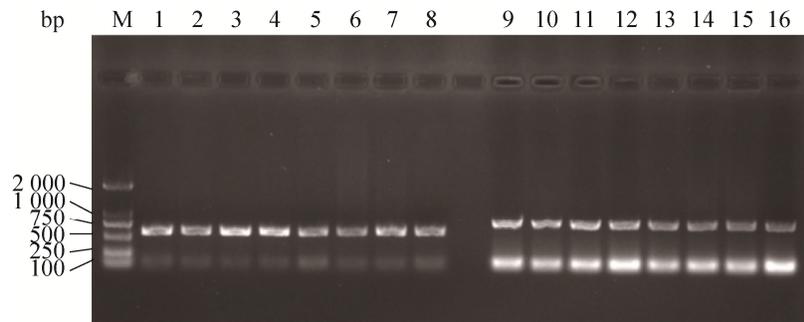


图1 阳性转化子的鉴定 M: DL2000 DNA Marker; 1-8: GFP 扩增片段(712 bp); 9-16: 潮霉素 B 扩增片段(750 bp)

Figure 1 Identification of positive transformants. M: DL2000 DNA Marker; 1-8: GFP amplification fragment 712 bp; 9-16: A 750 bp fragment of hygromycin B.

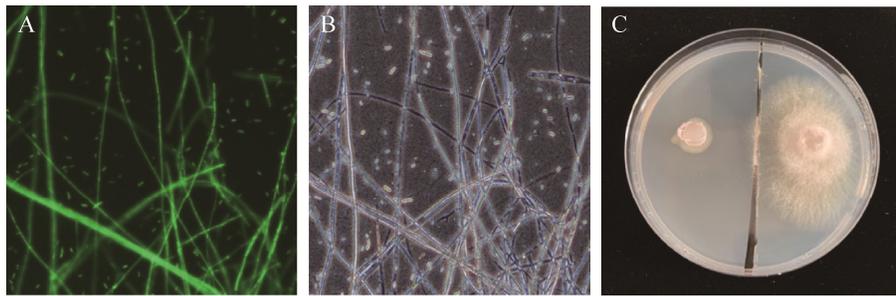


图2 转化子连续继代培养 7 代后的荧光观察及稳定性检测 A: 488 nm 视野下野生型菌丝和分生孢子 (200×); B: 明场(200×); C: 左侧为野生型 st89 菌株, 右侧为在含有潮霉素 B 培养基中连续培养 7 代后的 st-gfp17 突变体

Figure 2 Fluorescence observation and stability test of transformants after continuous subculture for 7 generations. A: Mycelium and conidia of wild type in the field of view at 488 nm (200×); B: Bright field (200×); C: The left is wild-type strain st89, and the right is st-gfp17 mutant after continuous culture for 7 generations in medium containing hygromycin B.

2.3 突变体的形态观察

野生型菌株 st89 在 PDA 培养基上培养, 菌丝呈绒毛状, 白色, 生长旺盛, 铺满培养皿, 部分产生紫色色素, 气生菌丝浓密, 菌落隆起, 边缘较整齐。

对 232 株供试突变体进行菌落形态的观察, 发现大多数突变体表现出与野生型菌株相似的形态特征, 其中有 17 株突变体在 PDA 培养基上发生了明显的变化(约占 7.32%), 其余突变体均与野生型表型一致。

突变体 s37、s39、s113、s151 菌落生长缓慢,

突变体 s28、s174 菌落为深紫色, 突变体 s37、s39、s42、s82 菌落为淡紫色, 突变体 s64、s74、s93、s113、s127、s131、s177、s182、s197、s218 菌落为浅黄色(表 1, 图 3)。

大部分突变体菌株在含有潮霉素 B 的 PDA 培养基上大致呈现 3 种菌落形态, 根据其形态将其命名为: (1) 菌丝 I 型(图 4A): 突变体菌落菌丝发达且分布均匀, 白色, 呈绒毛状; (2) 菌丝 II 型(图 4B): 突变体菌落菌丝白色, 呈绒毛状, 分布不均, 中间环状部分呈透明状, 稀疏, 菌丝不发达, 边缘为白色较浓密的菌丝; (3) 菌膜

型(图 4C): 突变体菌落呈透明状, 菌丝稀疏, 生长的不太旺盛, 呈灰白色紧贴培养基生长。

232 个突变体中菌丝 I 型有 133 个(约占 58.37%)、菌丝 II 型 67 个(约占 27.35%)、菌膜型

32 个(约占 14.29%)。同时发现突变体在含有潮霉素 B 抗性的平板上均为白色(图 5A), 而且菌丝相对稀疏, 但在不含潮霉素 B 的 PDA 培养基上均为紫色(图 5B)。

表 1 形态发生变化的突变体

Table 1 Morphological changes in mutants

突变体类型 Mutant type	突变体编号 Mutant No.
生长缓慢型 Slow growth type	s37, s39, s113, s151
深紫色 Modena	s28, s174
淡紫色 Lavender	s37, s39, s42, s82
浅黄色 Buff	s64, s74, s93, s113, s127, s131, s177, s182, s197, s218

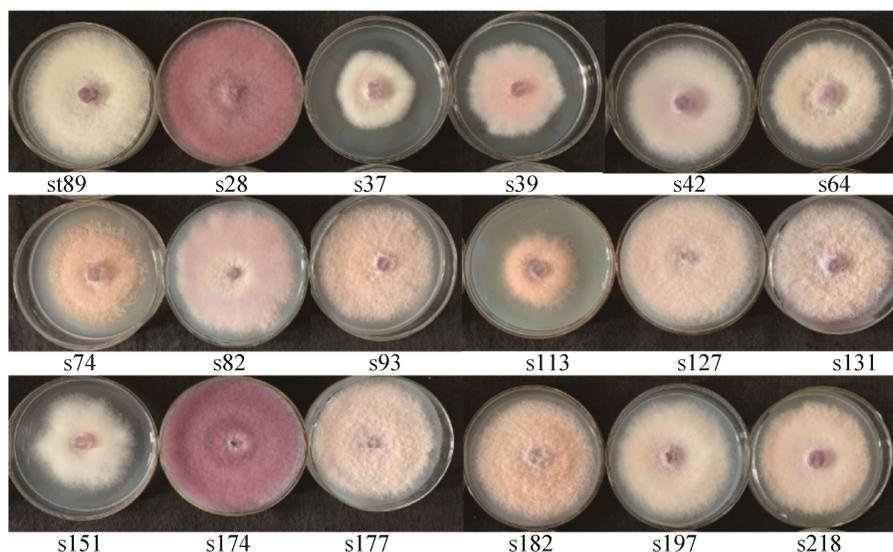


图 3 野生型菌株及突变体在 PDA 培养基上的菌落形态(26 °C, 7 d)

Figure 3 Colonial morphology of wild type strain st89 and mutants on PDA (26 °C, 7 days).

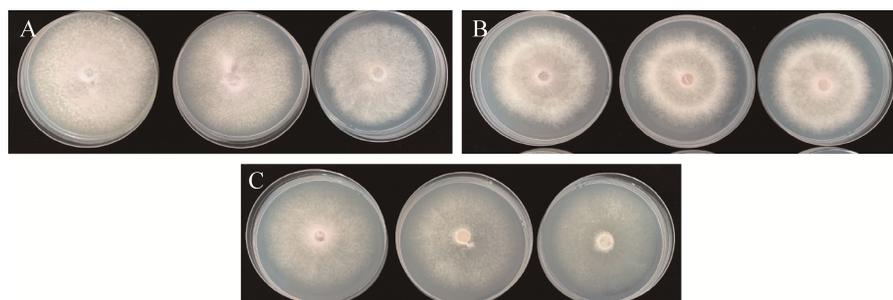


图 4 突变体在含有潮霉素 B 的 PDA 培养基上的菌落形态(26 °C, 7 d) A: 菌丝 I 型; B: 菌丝 II 型; C: 菌膜型

Figure 4 Colony morphology of mutants on PDA medium containing hygromycin B (26 °C for 7 days). A: Mycelium type I; B: Mycelium type II; C: Membrane type.

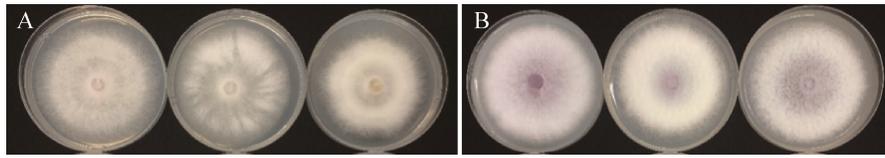


图5 突变体分别在有无潮霉素B的PDA培养基上的菌落形态(26 °C, 7 d) A: 含潮霉素B的PDA培养基; B: 不含潮霉素B的PDA培养基

Figure 5 Colony morphology of mutants on PDA medium with or without hygromycin B (26 °C for 7 days). A: PDA medium containing hygromycin B; B: PDA medium without hygromycin.

2.4 突变体生长速度的测定

野生型 st89 与突变体菌株分别在相同 PDA 培养基和相同的培养条件下进行培养, 都在 6 个培养皿下重复放入相同大小的菌饼(0.5 cm)进行培养, 每天采用十字交叉法测量菌落直径并记录数据, 直径测定的数据见图 6。

采用 Microsoft Excel 2019 软件统计并计算得出 st89 菌株 1-6 d 的平均直径分别为 (16.2±1.4) mm、(35.74±0.5) mm、(48.9±0.6) mm、(57.52±1.20) mm、(66.07±0.80) mm 和 (73.92±1.60) mm; 突变体 1-6 d 的平均直径分别为 (13.0±0.9) mm、(28.0±1.5) mm、(40.26±1.90) mm、(50.21±0.80) mm、(58.98±1.10) mm 和 (67.38±1.30) mm。突变体 1-6 d 在含潮霉素

B 的 PDA 培养基上的平均直径分别为(9.40±0.60) mm、(19.625±1.40) mm、(29.45±1.50) mm、(37.95±1.60) mm、(46.15±1.40) mm 和 (53.75±1.40) mm。

st89 菌株 1-6 d 的平均生长速度分别为 (16.20±1.40) mm、(19.54±0.70) mm、(13.16±0.90) mm、(8.62±0.80) mm、(8.55±0.50) mm 和 (7.851±1.200) mm; 突变体 1-6 d 的平均生长速度分别为(13.0±0.9) mm、(15±1.1) mm、(12.3±1.4) mm、(9.9±1.2) mm、(8.8±0.8) mm 和(8.4±1.8) mm。突变体 1-6 d 在含潮霉素 B 的 PDA 培养基上的平均生长速度分别为(9.4±0.6) mm、(10.2±0.9) mm、(9.9±1.2) mm、(8.5±0.7) mm、(8.2±0.9) mm 和 (7.6±1.3) mm。

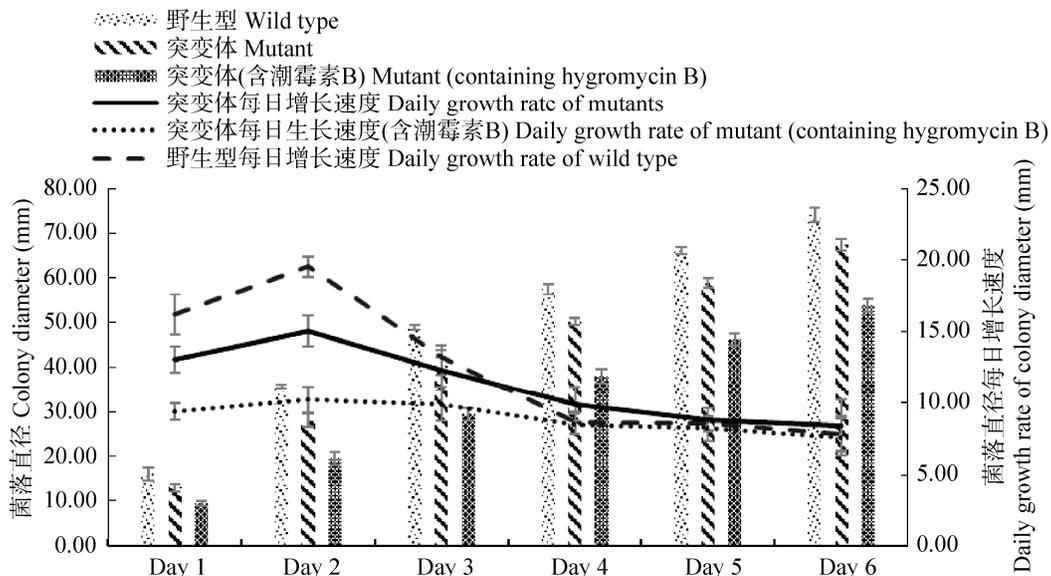


图6 突变体生长速度测定

Figure 6 Determination of mutant growth rate.

对野生型菌株和突变体菌株生长速度测定的相关数据采用 SPSS 26 进行处理, 对平均生长速度数据进行显著性分析, 得出野生型菌株和突变体菌株在不含潮霉素 B 培养基上的平均生长速度分别为 (12.32 ± 1.02) a mm 和 (11.23 ± 1.20) a mm。突变体在含潮霉素 B 的 PDA 培养基上的平均生长速度为 (8.97 ± 0.93) b mm。根据第 6 天的平均直径进行显著性分析, 得出野生型菌株和突变体菌株在第 6 天平均直径分别为 (73.92 ± 1.60) a mm 和 (67.38 ± 1.30) a mm; 而突变体菌株在含有潮霉素 B 培养基上第 6 天的平均直径为 (53.75 ± 1.40) b mm。所有得出的处理数据上小写的字母 a、b 表示在 $P=0.05$ 水平上的差异显著。

2.5 不同表型的突变体生长速度对比

对随机选择 3 种表型的突变体各 10 株共计 30 株突变体进行生长速度测定, 结果显示(图 7), 10 株菌丝 I 型的突变体在含有潮霉素 B 的 PDA 培养基上第 6 天时的菌落平均直径为 (55.40 ± 1.24) mm, 10 株菌丝 II 型的突变体第 6 天时的菌落平均直径为 (51.20 ± 1.26) mm, 10 株菌膜型的突变体第 6 天时的菌落平均直径为 (54.70 ± 1.98) mm。3 种表型的突变体在含有潮霉素 B 的 PDA 培养基上的生长速度大小排列为菌丝 I 型>菌膜型>菌丝 II 型。

10 株菌丝 I 型的突变体在不含有潮霉素 B 的

PDA 培养基上第 6 天时的菌落平均直径为 (67.30 ± 1.03) mm, 10 株菌丝 II 型的突变体第 6 天时的菌落平均直径为 (66.50 ± 1.31) mm, 10 株菌膜型的突变体第 6 天时的菌落平均直径为 (68.30 ± 1.20) mm。3 种表型的突变体在含有潮霉素 B 的 PDA 培养基上的生长速度大小排列为菌膜型>菌丝 I 型>菌丝 II 型。

2.6 突变体产孢量测定

对随机选择 3 种表型的突变体各 10 株共计 30 株突变体进行产孢量测定, 结果显示, 产孢量显著低于野生型的有 14 个, 占 46.67%, 平均产孢量比野生型菌株降低了 30.47%; 产孢量显著高于野生型的有 1 个 A-1, 产孢量为 1.43×10^7 个/mL, 占 3.33%; 有 15 株突变体的产孢量与野生型差异不显著, 占 50%。其中菌丝 I 型的平均产孢量为 (7.15 ± 0.55) 个/mL; 菌丝 II 型的平均产孢量为 (6.47 ± 0.61) 个/mL, 菌膜型的平均产孢量为 (4.39 ± 0.47) 个/mL, 野生型平均产孢量为 (7.06 ± 0.34) 个/mL, 3 种表型的突变体产孢量大小排列为菌丝 I 型>菌丝 II 型>菌膜型, 菌丝 II 型和菌膜型的产孢量显著低于野生型(图 8)。

2.7 不同 pH 对转化子生长的影响

在 pH 值分别为 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的 PDA 培养基上生长 5 d, 野生型最适生长 pH 值为 8.0, 其生长速度为 (75.43 ± 1.33) mm, 突变

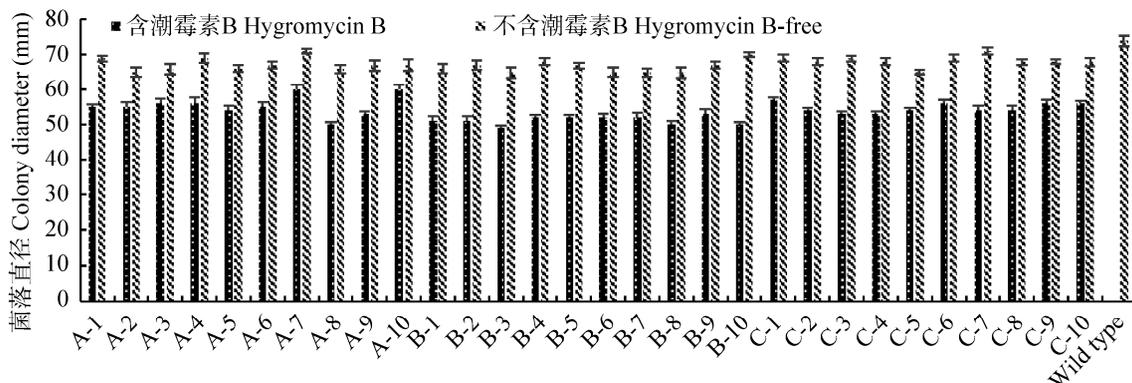


图 7 不同表型的突变体生长速度对比

Figure 7 Comparison of growth rate of mutants with different phenotypes.

体 A-1、B-1、C-1、C-2 最适 pH 值为 7.0, 生长速度分别为(67.60±1.50) mm、(67.45±1.52) mm、(66.85±1.75) mm、(67.93±1.83) mm; 突变体 A-2、B-2 最适 pH 值为 8.0, 生长速度分别为(67.69±1.59) mm、(68.53±1.43) mm。从 pH 值对生长速度的影响来看, 各 pH 值梯度对转化子生长的影响不明显, 在 pH 6.0–11.0 范围内, 各转化子生长速度趋势基本都是先升高后降低, 而且各菌株之间的生长速度基本一致, 并无明显差异(图 9)。

2.8 突变体致病性测定

对突变体致病力的测定结果显示, 经过突变

体 A-1 接菌的海岛棉其病情指数为(48.44±7.03), 高于野生型(39.71±7.14), 但差异不显著, 增加了 21.98%; 经过突变体 A-3、A-7、C-4 接菌的海岛棉其病情指数为(29.940±2.346)、(30.970±1.226)、(31.840±2.146)低于野生型, 但差异不显著, 平均减少了 22.15%。其中, A-2、A-5、A-9、A-10、B-7、B-8、B-10、C-2 共计 8 株的致病力相比野生型有所提高; A-4、A-6、A-8、B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、B-6、B-9、C-1、C-3、C-5、C-6、C-7、C-8、C-9、C-10 共计 18 株突变体的致病力相比野生型菌株均有不同程度的下降(图 10)。

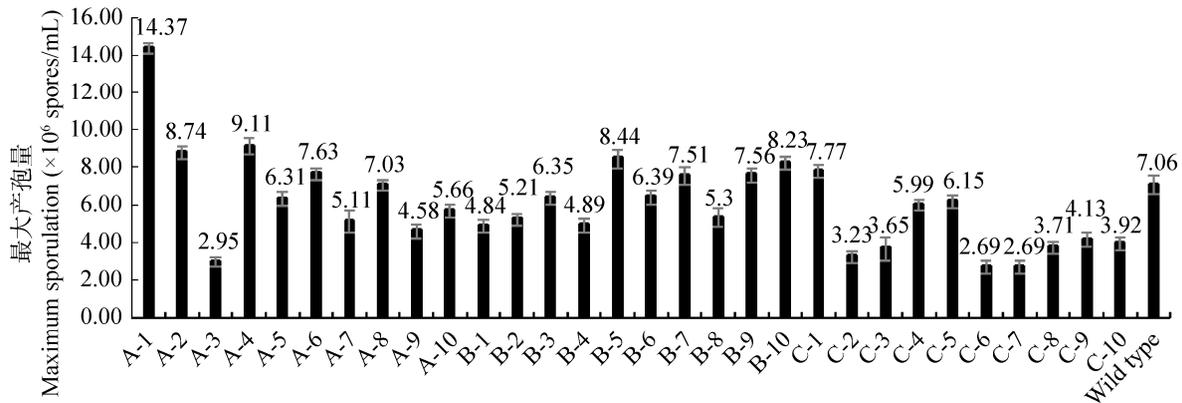


图 8 突变体产孢量测定

Figure 8 Mutants sporulation determination.

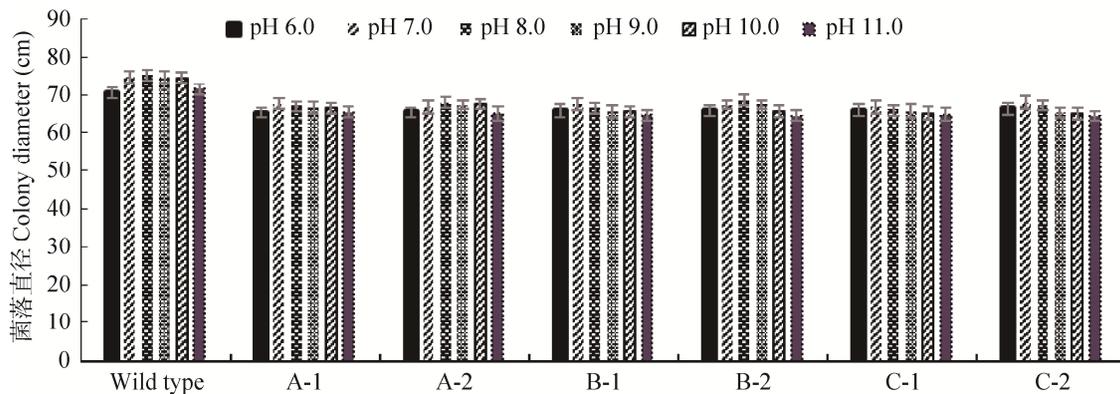


图 9 不同 pH 对转化子生长的影响

Figure 9 Effect of different pH on the growth of transformants.

同时, 通过 SPSS 分析比较菌落直径及产孢量和致病力的相关性可以看出, 致病力和产孢量呈显著相关, 其相关系数为 0.396, 其余均无相关性(表 2)。

2.9 T-DNA 插入拷贝数分析

由于 PCR 扩增有时得到的产物特异性较差, 会出现假阳性扩增, 因而对转化子的阳性检测还需要进行 Southern 杂交, 该方法是检测外源基因导入的重要手段。随机挑选出 8 个经 PCR 及荧光检测鉴定为阳性的突变体, 通过地高辛标记的 GFP 探针进行 Southern 杂交, 以检测 T-DNA 在突变体中的插入拷贝数。

Southern 杂交结果(图 11)显示, 每个突变体所出现的杂交带其大小和位置均有差别, 说明质粒基因 T-DNA 是随机插入的, 每出现一条杂交条带就表明有一个拷贝的外源基因插入。可以看出 1-8 泳道突变体均出现杂交条带, 其中 2、4、8 泳道出现 2 条杂交条带, 通过 Southern 杂交图也可以看出农杆菌介导 T-DNA 转化棉花枯萎病菌主要以随机的单拷贝插入为主, 但也存在双拷贝的情况, 检测的 8 株转化子中, 有 5 株为单拷贝插入, 占检测结果的 62.5%。说明 T-DNA 已成功且随机地插入到转化子的基因组中。

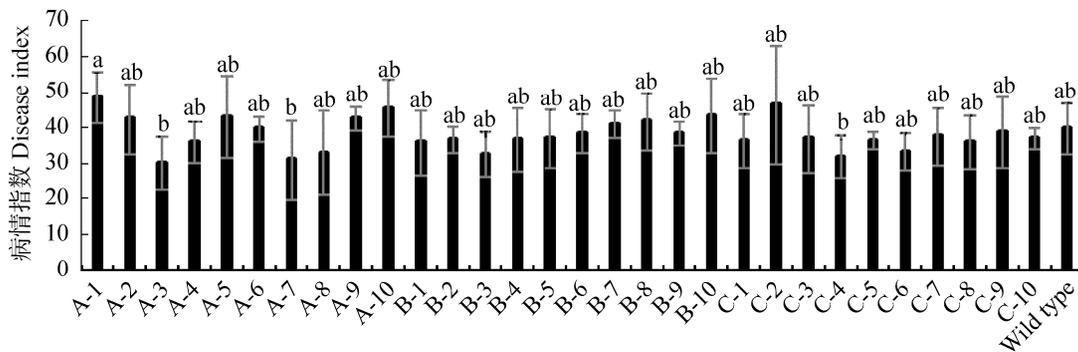


图 10 突变体致病性测定 a、b、c 为差异显著性标记

Figure 10 Mutants pathogenicity test. a, b, c are significant difference markers.

表 2 不同性状的皮尔逊相关性分析

Table 2 Pearson correlation analysis of different traits

不同性状	产孢量	菌落直径	致病力
Different traits	Sporogenous amount	Colony diameter	Pathogenicity
产孢量	1		
Sporogenous amount			
菌落直径	-0.073	1	
Colony diameter	0.701		
致病力	0.396*	0.018	1
Pathogenicity	0.031	0.927	

注: *: 显著相关($n=30, P<0.05$)

Note: *: Significant correlation at 0.05 level ($n=30, P<0.05$).

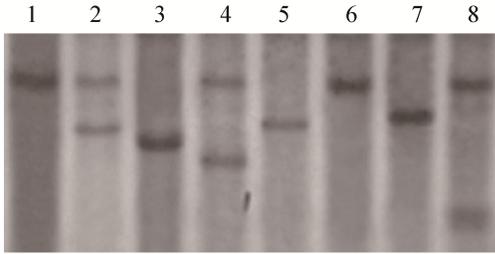


图 11 突变体中 T-DNA 插入情况分析 1-8: 突变体 A-1、A-2、A-6、B-1、B-2、B-3、C-1、C-2
Figure 11 Analysis of T-DNA insertion in mutants. 1-8: Mutants A-1, A-2, A-6, B-1, B-2, B-3, C-1, C-2.

3 讨论与结论

将一已知外源 DNA 序列随机插入某一基因中引起的插入突变能够对突变基因进行标记,便于对其进行克隆和分析^[12]。然而当 T-DNA 整合到棉花枯萎病菌的染色体上时,由于插入位点是随机的,所以可能会影响到转化子的菌落形态、生长速度和菌落颜色。因此,为全面了解棉花枯萎病菌的生理特性、致病机理及其与寄主植物相互作用机制,本文从多方面对其进行了研究,对筛选的突变体的生物学特性等进行了分析,为下一步的系统研究提供相应的材料,也为研究其他丝状真菌生长发育的分子机理提供借鉴。

本实验随机挑选的 232 株突变体在 PDA 培养基上有 92.67% 的菌落表型与野生型无差别,4 株突变体菌落生长缓慢,2 株突变体菌落为深紫色,4 株突变体菌落为淡紫色,10 株突变体菌落为浅黄色,1 株无颜色变化。大部分突变体菌株在含有潮霉素 B 的 PDA 培养基上根据其形态将其分为菌丝 I 型、菌丝 II 型、菌膜型。这可能与 T-DNA 随机插入基因及插入拷贝数不同而引起不同表型变化有关。

通过对随机选取的 30 株突变体进行生长速率、产孢量及致病力的测定,发现有部分菌株的生长速率、产孢量及致病力发生变化(表 3)。根

据突变体及野生型菌株生长速度的测定发现,突变体在不含潮霉素 B 的培养基上的生长速度比野生型慢,但差异不显著,而突变体在外源添加潮霉素 B 的培养基上的生长速度相比不添加潮霉素的培养基显著降低。同时发现 3 种不同表型的突变体生长速度大小排列为菌丝 I 型>菌膜型>菌丝 II 型。3 种表型的突变体在含有潮霉素 B 的 PDA 培养基上生长速度大小排列为菌膜型>菌丝 I 型>菌丝 II 型。同时可以看出野生型菌株和突变体菌株都是在培养基上逐渐生长,重复组的生长直径大小每天基本保持相同范围内增长,直到第 6 天受到培养基营养物消耗殆尽和培养基本身大小的限制生长都变缓慢。对突变体产孢量的测定结果发现大部分转突变体产孢量与野生型差异不显著,14 个突变体产孢量显著低于野生型,占 46.67%,平均产孢量比野生型菌株降低了 30.47%;1 株突变体 A-1 产孢量为 1.43×10^7 个/mL,显著高于野生型,占 3.33%。同时从 pH 值对生长速度的影响来看,各 pH 值梯度对转化子的生长影响不明显。对突变体致病力的测定结果显示,其中 A-1 的致病力高于野生型的致病力,但差异不显著,增加了 21.98%;3 株突变体致病力低于野生型,但差异不显著,平均减少了 22.15%。8 株突变体的致病力相比野生型有所提高,16 株突变体的致病力相比野生型菌株均有不同程度的下降,但均无明显差异。

根据突变体的菌落直径、产孢量和致病力的相关性可以看出,致病力和产孢量呈显著相关,其相关系数为 0.396,其余均无相关性,可以看出突变体产孢量和致病力的变化规律不同于生长速度,如:突变体 A-1 的产孢量和致病力均明显高于野生型菌株,但其生长速度与野生型差异并不显著。因此,推测棉花枯萎病菌的致病力与其产孢量有一定的相关性。利用农杆菌介导的真菌遗

表 3 不同突变体表型及其生物学特性

Table 3 Phenotypic and biological characteristics of different mutants

突变体 Mutants	菌落表型 Colony phenotype	菌落颜色 (含潮霉素 B) Colour of colony (containing hygromycin B)	菌落颜色 Colony color	最大产孢量 Maximum sporulation ($\times 10^6$ spores/mL)	菌落直径 Colony diameter (mm)	菌落直径 (含潮霉素 B) Colony diameter (containing hygromycin B) (mm)	致病性 Pathogenicity
A-1	Hypha- I	White	Modena	14.37	69.00	55.00	48.44
A-2	Hypha- I	White	White	8.74	65.00	55.00	42.39
A-3	Hypha- I	White	White	2.95	66.00	56.00	29.94
A-4	Hypha- I	White	White	9.11	69.00	56.00	35.92
A-5	Hypha- I	White	White	6.31	66.00	54.00	43.01
A-6	Hypha- I	Modena	Modena	7.63	67.00	55.00	39.69
A-7	Hypha- I	White	White	5.11	71.00	60.00	30.97
A-8	Hypha- I	White	White	7.03	66.00	50.00	32.77
A-9	Hypha- I	White	White	4.58	67.00	53.00	42.49
A-10	Hypha- I	White	White	5.66	67.00	60.00	45.48
B-1	Hypha- II	White	White	4.84	66.00	51.00	35.86
B-2	Hypha- II	White	White	5.21	67.00	51.00	36.54
B-3	Hypha- II	White	White	6.35	65.00	49.00	32.56
B-4	Hypha- II	White	White	4.89	68.00	52.00	36.65
B-5	Hypha- II	White	Buff	8.44	67.00	52.00	36.98
B-6	Hypha- II	White	White	6.39	65.00	52.00	38.40
B-7	Hypha- II	White	Buff	7.51	65.00	52.00	40.89
B-8	Hypha- II	White	White	5.30	65.00	50.00	41.80
B-9	Hypha- II	Lilac	White	7.56	67.00	53.00	38.42
B-10	Hypha- II	White	White	8.23	70.00	50.00	43.39
C-1	Pellicle	White	White	7.77	69.00	57.00	36.20
C-2	Pellicle	White	White	3.23	68.00	54.00	46.22
C-3	Pellicle	White	White	3.65	69.00	53.00	36.78
C-4	Pellicle	White	White	5.99	68.00	53.00	31.84
C-5	Pellicle	White	White	6.15	65.00	54.00	36.39
C-6	Pellicle	White	White	2.69	69.00	56.00	33.20
C-7	Pellicle	White	White	2.69	71.00	54.00	37.49
C-8	Pellicle	Lilac	White	3.71	68.00	54.00	35.96
C-9	Pellicle	White	White	4.13	68.00	56.00	38.69
C-10	Pellicle	White	White	3.92	68.00	56.00	36.86
Wild type	-	-	White	7.06	73.92	-	39.71

注: -: 无结果

Note: -: No result.

传转化,可以使载体携带的 T-DNA 随机插入到受体菌的基因组中,并且单拷贝率很高,这使我们可以基因组范围内建立真菌的突变体库,更好地进行基因功能研究^[13]。通过 Southern 杂交结果显示单拷贝率为 62.5%,单拷贝率高对后续进行棉花枯萎病菌相关基因的研究有着重要的作用。

综上所述,最终筛选出的菌落表型与野生型有差异的突变体中,4 株突变体菌落生长缓慢;2 株深紫色,4 株淡紫色,10 株浅黄色,1 株无颜色变化;突变体 A-7 和 A-10 生长速度增高;突变体 A-1 致病力增加,A-3、A-7、C-4 致病力下降,A-1 产孢量升高,C-6、C-7 产孢量降低。

REFERENCES

- [1] Wang C, He XW, Li YZ, Wang LJ, Guo XL, Guo XQ. The cotton MAPK kinase GhMPK20 negatively regulates resistance to *Fusarium oxysporum* by mediating the MKK4-MPK20-WRKY40 cascade[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(7): 1624-1638
- [2] Qiu L, Yang HH, Lei F, Fan SG, Xie MH, Wang ZJ. Studies on the bacteriostasis of nano-silver on the pathogenic fungus *Botrytis cinerea* from illed plants[J]. *Applied Mechanics and Materials*, 2014, 651/652/653: 352-361
- [3] 陈其焱, 孙文姬. 我国棉花枯萎镰刀菌种的研究[J]. *中国农业科学*, 1992, 25(3): 1-8, 97
Chen QY, Sun WJ. Studies on species of cotton *Fusarium* wilt pathogen in China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1992, 25(3): 1-8, 97 (in Chinese)
- [4] 刘宁. 玉米大斑病菌漆酶基因家族鉴定及关键基因的功能解析[D]. 保定: 河北农业大学博士学位论文, 2019
Liu N. Identification and functional analysis of laccase genes family in *Setosphaeria turcica*[D]. Baoding: Doctoral Dissertation of Hebei Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [5] 王凯, 东保住, 张贵, 张键, 张园园, 周洪友, 赵君. GFP 标记的马铃薯大丽轮枝菌生物学特性研究[J]. *华北农学报*, 2016, 31(6): 88-93
Wang K, Dong BZ, Zhang G, Zhang J, Zhang YY, Zhou HY, Zhao J. The study on biological characteristics of GFP labeled potato *Verticillium dahliae*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2016, 31(6): 88-93 (in Chinese)
- [6] 李思蒙, 王永林, 黄冬辉, 田呈明. 杨树炭疽病菌原生质体遗传转化的建立及绿色荧光蛋白的表达[J]. *林业科学*, 2013, 49(5): 121-127
Li SM, Wang YL, Huang DH, Tian CM. Establishment of a PEG-mediated genetic transformation system and expression of green fluorescence protein in *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2013, 49(5): 121-127 (in Chinese)
- [7] 赵凤轩. 绿色荧光蛋白标记的大丽轮枝菌的获得及其在棉花中侵染过程研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2010
Zhao FX. Production of *Verticillium dahliae* kleb tagged by green fluorescence protein and its infection process in cottons[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 (in Chinese)
- [8] 陈凤, 王坤, 银超, 李德明, 任楠, 李俊星. 根癌农杆菌介导的泡盛曲霉遗传转化系统的构建[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(16): 8800-8805
Chen F, Wang K, Yin C, Li DM, Ren N, Li JX. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation system for *Aspergillus awamori*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(16): 8800-8805 (in Chinese)
- [9] 罗中钦, 程琳, 张茜, 陈国华. 丝状真菌 PCR 模板 DNA 的快速制备方法[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(9): 79-83
Luo ZQ, Cheng L, Zhang X, Chen GH. A rapid method of preparing DNA template of filamentous fungi for PCR amplification[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(9): 79-83 (in Chinese)
- [10] 刘丹, 李焕宇, 付婷婷, 张云, 吕天佑, 李远, 李敏权, 徐秉良. 基于正交试验设计优化真菌 DNA 提取的 CTAB 法[J]. *甘肃农业大学学报*, 2017, 52(2): 139-145
Liu D, Li HY, Fu TT, Zhang Y, Lyu TY, Li Y, Li MQ, Xu BL. Optimization of CTAB methods for extraction of fungal DNA based on the orthogonal experiment[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2017, 52(2): 139-145 (in Chinese)
- [11] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002
Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning*[M]. Huang PT, trans. Beijing: Science Press, 2002 (in Chinese)
- [12] 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用[J]. *广东农业科学*, 2019, 46(3): 93-100
He LY, Zhang SL, Cui BY, Zhu QF, Liu SJ, Liu WH. Application of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Magnaporthe oryzae*[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2019, 46(3): 93-100 (in Chinese)
- [13] 范亮波, 李梅, 冀颖, 刘卫德, 蒋细良. 根癌农杆菌介导的木霉遗传转化及应用进展[J]. *生物技术通报*, 2010(3): 1-5, 12
Fan LB, Li M, Ji Y, Liu WD, Jiang XL. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and its application in *Trichoderma* spp.[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(3): 1-5, 12 (in Chinese)