

研究报告

T-DNA 插入筛选棉花枯萎病菌致病力减弱突变体及其侧翼序列分析

何丹^{1,2,3}, 苏飞鸿^{1,2,3}, 张李娅^{1,2,3}, 宋东博^{1,2,3}, 夏红飞^{1,2,3}, 顾爱星^{*1,2,3}

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护重点实验室, 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

何丹, 苏飞鸿, 张李娅, 宋东博, 夏红飞, 顾爱星. T-DNA 插入筛选棉花枯萎病菌致病力减弱突变体及其侧翼序列分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1732-1740.

HE Dan, SU Feihong, ZHANG Liya, SONG Dongbo, XIA Hongfei, GU Aixing. Screening and flanking sequences of T-DNA insertion mutants with reduced pathogenicity in cotton *Fusarium oxysporum*[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1732-1740.

摘要:【背景】新疆是棉花生产的主要地区, 枯萎病的发生严重影响着棉花的产量。目前, 关于棉花枯萎病原菌的发病机制尚无详细报道。【目的】在尖孢镰刀菌突变体库中筛选出致病力降低的突变体并分析其致病基因, 以阐明棉花枯萎病菌的致病分子机制。【方法】在前期已建立的枯萎病菌突变体库的基础上, 对随机挑选的 136 份突变体致病力进行鉴定, 并对其表型和侧翼序列进行分析。【结果】获得 5 个致病能力明显降低的突变株, 突变体 B-18 的形态与野生型有差异且菌落颜色变为紫色; 5 个突变体生长速率均降低, 其中 B-18 下降最明显; 5 个突变体产孢数量均降低。扩增 5 个突变体, 测序后经 BLAST 比对分析, 确定了 T-DNA 在枯萎病菌基因组的分布情况。【结论】对筛选出的 5 个致病力缺陷的突变体进行分析并找到致病基因, 为研究棉花致病基因的功能和克隆提供了坚实的理论基础。

关键词: 棉花; 尖孢镰刀菌; T-DNA 插入突变体; 高效热不对称交错 PCR; 致病力

资助项目: 新疆维吾尔自治区科技厅自然科学基金(2022D01A188); 新疆棉花产业技术体系(XJARS-03)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Science and Technology Department of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022D01A188) and the Xinjiang Cotton Industry Technology System of Xinjiang Uygur Autonomous Region (XJARS-03).

*Corresponding author. E-mail: gax@xjau.edu.cn

Received: 2023-09-19; Accepted: 2023-11-04; Published online: 2023-12-19

Screening and flanking sequences of T-DNA insertion mutants with reduced pathogenicity in cotton *Fusarium oxysporum*

HE Dan^{1,2,3}, SU Feihong^{1,2,3}, ZHANG Liya^{1,2,3}, SONG Dongbo^{1,2,3}, XIA Hongfei^{1,2,3}, GU Aixing^{*1,2,3}

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

2 Key Laboratory of 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

Abstract: [Background] Xinjiang is the main producing area of cotton, and *Fusarium* wilt seriously affects the cotton yield. However, the detailed pathogenesis of cotton *Fusarium* wilt remains to be reported. [Objective] To select the mutants with reduced pathogenicity from the *Fusarium oxysporum* mutant library and identify their genes conferring pathogenicity, so as to elucidate the molecular mechanism of the pathogen in causing *Fusarium* wilt in cotton. [Methods] On the basis of the previously established mutant library of *F. oxysporum*, By the identification of 136 randomly selected pathogenic mutants. Furthermore, we analyzed the phenotypes and flanking sequences. [Results] we screened out five mutants with significantly reduced pathogenicity, the morphology of mutant B-18 was different from that of the wild type, with purple colonies. The growth rate of the five mutants, especially B-18, decreased. In addition, the five mutants showed reduced spore production. After sequencing of the five mutants, Blast analysis was performed to determine the distribution of T-DNA in the pathogen genome. [Conclusion] From the five mutants with reduced pathogenicity, we identified the genes associated with the pathogenicity. The findings provide a solid theoretical basis for the functional research and cloning of the genes associated with the diseases in cotton.

Keywords: cotton; *Fusarium oxysporum*; T-DNA insertion mutants; hi TAIL-PCR; pathogenicity

棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* 是一种植物维管束病害, 具有广泛的寄主范围^[1-2]。目前, 国内外已报道了甜瓜^[3]、香蕉^[4]、黄瓜^[5]和草莓^[6]等 100 多种植物。这些寄主植物的感染严重影响了农业生产, 造成相当大的损失。棉花枯萎病严重影响了棉花的生长发育和产量品质^[7]。截至目前, 棉花枯萎病菌的致病机理报道较少, 为揭示棉花枯萎病菌的致病机制, 需要对致病相关的基因进行鉴定^[8-10]。目的基因的功能可以通过对突变体表型变化的观察进行分析^[11]。根癌农杆菌介导的遗传转化技术是一项在研究

基因功能方面极为有效的工具。这项技术的首次成功应用是对粗糙脉孢菌进行遗传转化^[12], 此后根癌农杆菌介导的遗传转化技术(*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation, ATMT)被广泛应用(图 1)。通过利用该技术构建突变体库, 对病原菌表型进行鉴定并分析插入位点的序列, 确定突变基因, 进而对与致病有关的基因及其作用进行分离和研究, 从而筛选出海岛棉中致病力减弱的突变体^[14]。目前已有学者报道了一些与致病有关的基因, 例如, 甜瓜枯萎病菌中的 *SNT2* 基因^[15]、香蕉枯萎病菌中的 *OCH1*

待棉花长到“两叶一心”之后,通过伤根的形式,取 30 mL 孢子悬浮液进行接种,同时以菌株 st89 为阳性对照、无菌水为阴性对照。等待 4 周后对植株的抗性进行鉴定,设置 3 个重复。

1.5 突变体菌落形态及生长速率测定

以野生型 st89 为对照,将突变体菌株在 PDA 平板上进行活化,26 °C 培养 7 d。观察菌落的颜色变化及形态并拍照记录,同时测量菌落的直径,计算菌丝的生长速率(cm/d),设置 3 个重复。

生长速率(cm/d)=(第 7 天的菌落直径-第 2 天的菌落直径)/5。

1.6 突变体菌株产孢能力的测定

将野生型菌株 st89 以及突变体菌株接种于 PDA 平板上,26 °C 培养 7 d,用打孔器打直径为 4 mm 的菌饼加入到 50 mL 灭菌的查氏液体培养基中,制作分生孢子悬浮液,在恒温 25 °C、180 r/min 的条件下振荡培养 7 d 后用血球计数板计数,计算其产孢量,设置 3 个重复。孢子

数目计算方法为:

孢子数(mL)=所数小方格中孢子总数 $\times 400 \times 10^4 \times$ 稀释倍数/所数的小方格数。

1.7 突变体的分子检测

在 PDA 培养基上收集菌丝。按照真菌 DNA 提取试剂盒说明书提取野生型 st89 和突变体的 DNA。以菌株 st89 和突变体的 DNA 为模板,以 GFP-F 和 GFP-R 为引物进行 PCR 检测(表 1)。参考文献[19]的 PCR 反应体系及反应条件。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8 突变体侧翼序列的克隆与分析

利用高效热不对称交错 PCR (high-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR, hiTAIL-PCR)技术,以野生型菌株和致病力减弱突变体菌株的基因组 DNA 为模板扩增 T-DNA 插入侧翼序列。PCR 反应程序的设置参考文献[20]等扩增方法。经过 3 次 Hi TAIL-PCR 反应后,通过胶回收试剂盒回收 PCR 产物并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,将测序结果进行分析比对。

表 1 本实验使用引物

Table 1 Primer used in this experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
GFP-F	ACGGCAAGCTGACCCCTGAAG
GFP-R	CTCGTCCATGCCGAGAGTGA
LAD 1	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNGGAA
LAD 2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNNBNNNGGTT
LAD 3	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNGGAA
LAD 4	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNNBNNNGGTT
LAD 5	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBHNDNNNGACC
AC	ACGATGGACTCCAGAG
RB1	CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA
RB2	ACGATGGACTCCAGTCGTGCCAAAGGCAATACCCTGCG
RB3	GCGGAGGAGTTCTTCGTTGCGGGTT

LAD 1-LAD 5: 简并引物; RB1-RB3: 特异性嵌套引物; V=A/G/C, H=A/C/T, D=A/G/T, B=G/C/T, N=A/G/C/T

LAD 1-LAD 5: Degenerate primer; RB1-RB3: Specific nested primer; V=A/G/C, H=A/C/T, D=A/G/T, B=G/C/T, N=A/G/C/T.

2 结果与分析

2.1 突变体致病力的测定结果

以野生型菌株 st89 为对照, 对 136 个突变体进行致病力的测定(图 2)。结果表明, 有 39 个突变体表现出显著变化, 其中 22 株突变体菌株的病情指数显著高于对照($P<0.05$), 17 个突变体的致病力有不同程度的下降。其中 A-22、B-18、B-20、B-22 和 C-18 这 5 个突变体致病力明显降低, 分别为 23.75、30.21、34.92、31.05 和 24.35。

2.2 致病力降低突变体菌落形态特征的观察

对筛选出的 5 个致病力减弱的突变体的菌落颜色及形态进行观察。结果表明, 突变体 A-22、B-20、B-22 和 C-18 的菌落形态与野生型菌株 st89 差异很小。而突变体 B-18 的菌丝形态更加紧凑致密, 菌落边缘呈现出不规则的形状, 并且菌落的颜色与野生型菌株 st89 相比呈紫色, 这与野生型菌株 st89 存在较大的差异(图 3)。

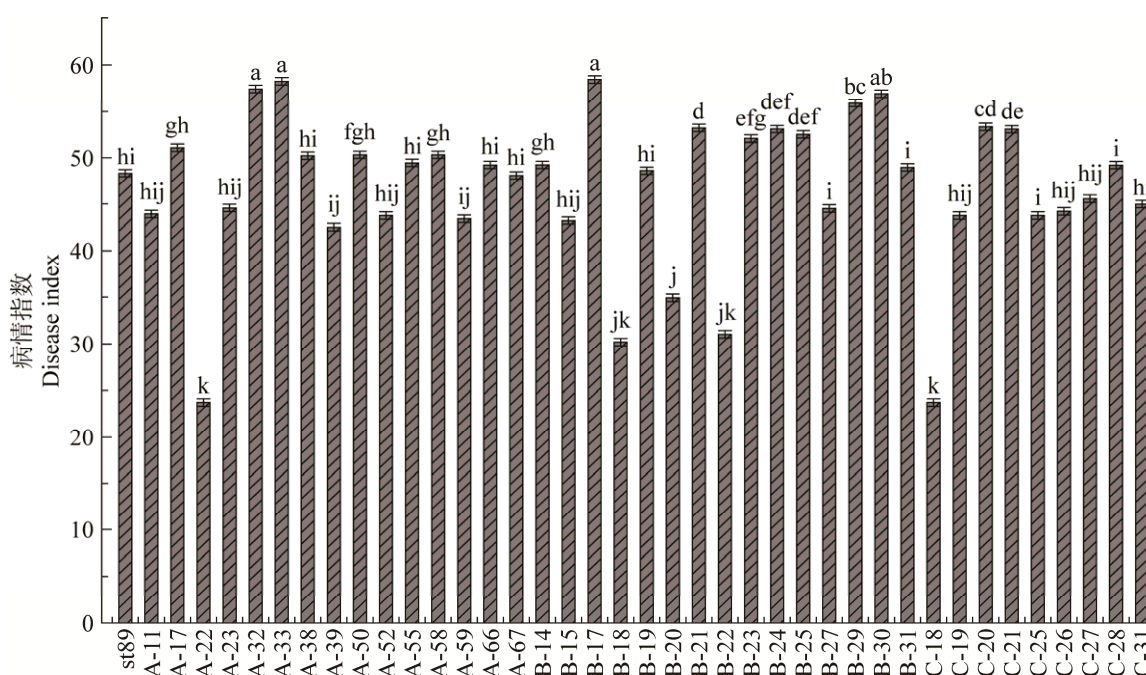


图 2 突变体的致病力筛选 不同小写字母表示差异显著, 下同

Figure 2 Pathogenicity screening of the mutants. Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

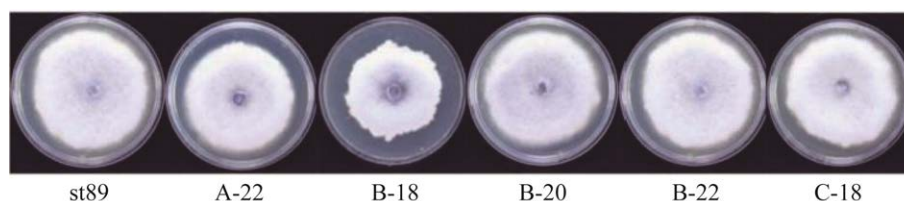


图 3 野生型菌株 st89 及突变体的菌落形态特征观察

Figure 3 Observation on colony morphology of wild type strain st89 and mutants.

2.3 致病力降低突变体生长速率的测定结果

对致病力降低突变体的菌落直径进行测量。结果显示,相较于野生型菌株 st89 的菌落直径(4.83 cm),突变体 B-18 的生长速率明显减慢,其菌落直径只有 3.72 cm;而突变体 A-22、B-20、B-22 和 C-18 的菌落直径分别为 4.83、5.23、4.96 和 5.10 cm,与野生型菌株无明显差别(图 4)。

2.4 致病力降低突变体产孢量分析

对 5 个致病力降低的突变体的产孢量进行测定,结果如图 5 所示。五个突变体产孢数量与野生型 st89 (7.12×10^6 个/mL)相比均显著降低,分别降低 61.09%、49.72%、70.65%、41.29%和 56.60%。

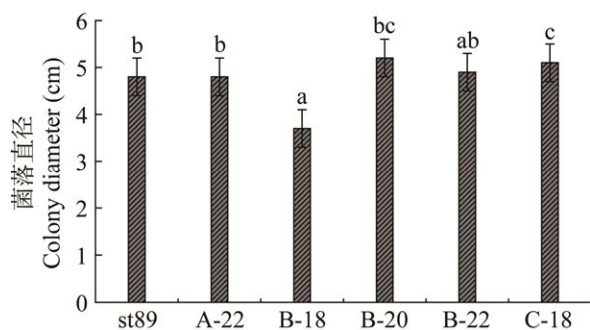


图 4 野生型菌株 st89 和突变体菌落直径测定
Figure 4 Colony diameter determination for wild type strain st89 and mutants.

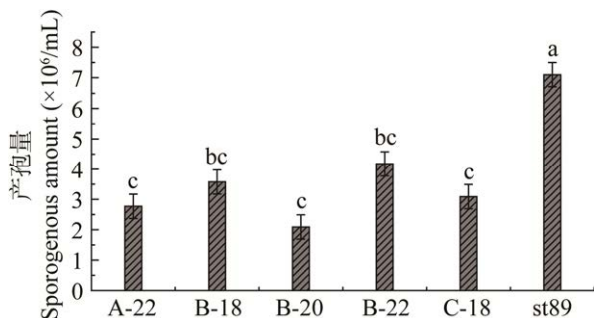


图 5 野生型菌株 st89 和突变体孢子产量测定
Figure 5 Number of conidia of wild type strain st89 and mutants.

2.5 T-DNA 插入稳定性 PCR 检测

以 GFP-F 和 GFP-R 为引物,对突变体和野生型菌株 st89 进行扩增。PCR 结果表明(图 6),野生型菌株未扩增出条带,而 5 个突变体菌株均可以扩增得到约 712 bp 的特异条带。这表明在突变体的基因组中稳定地插入了 T-DNA。

2.6 致病力降低突变体侧翼序列的克隆

五株致病力减弱突变体经过 3 轮 PCR 反应后,获得 100–500 bp 的条带(图 7)。对 PCR 产物进行切胶回收并由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果通过 Ensembl 数据库中的 BLAST 比较分析,发现与尖孢镰刀菌基因组的相似性超过 95.0%。对获得的 5 个侧翼序列信息比较分析发现 T-DNA 分别插在基因编码区和内含子区(表 2)。5 个插入位点分别插

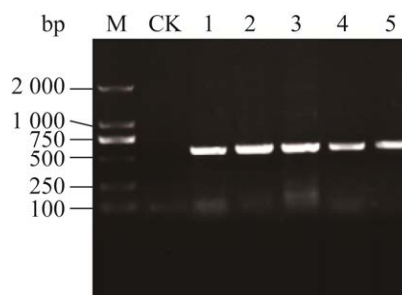


图 6 T-DNA 突变体的 PCR 检测
Figure 6 PCR detection of T-DNA mutants. M: DL2000 DNA Marker; CK: st89; 1–5: T-DNA insertion transformant.

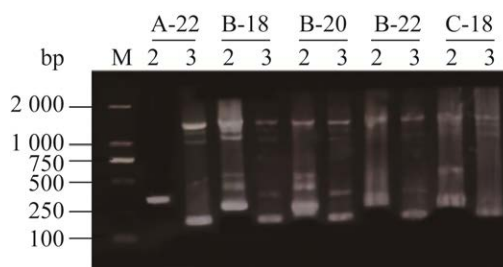


图 7 5 个致病力降低突变体的 hi TAIL-PCR 检测
Figure 7 hi TAIL-PCR of five reduced pathogenicity mutants. M: DL2000 DNA Marker; 2 and 3: Second and third rounds of products.

表 2 突变体的侧翼序列分析

Table 2 Flanking sequence analysis of the mutants

突变体 Mutants	插入位点 Insertion site	突变基因 Mutant gene	片段长度 Fragment length (bp)	基因注释 Gene annotation	染色体号 Number of the chromosome
A-22	第 2 个内含子 2nd intron	<i>FOXG_01685</i>	321	假定蛋白 Hypothetical protein	5
B-18	第 5 个外显子 5th exon	<i>FOXG_05113</i>	3 239	类似于泛素 C 端水酶的假设蛋白质 Hypothetical protein similar to ubiquitin C-terminal hydrolase	7
B-20	第 1 个外显子 1st exon	<i>FOXG_09561</i>	1 934	假定蛋白 Hypothetical protein	11
B-22	第 5 个外显子 5th exon	<i>FOXG_02694</i>	1 476	类似葡聚糖酶的蛋白质 Hypothetical protein similar to glucanase	8
C-18	第 1 个外显子 1st exon	<i>FOXG_03874</i>	558	保守假设蛋白 Conserved hypothetical protein	4

人在尖孢镰刀菌的 5 条不同染色体上,表明 T-DNA 在尖孢镰刀菌基因组中的插入是随机发生的。进一步分析发现,在 5 个棉花枯萎病菌致病相关基因中,突变体 B-18 的插入位点位于 Chromosome7,突变基因为 *FOXG_05113*,所编码的蛋白是类似于泛素 C 端水酶的假设蛋白质。突变体 B-22 的插入位点位于 Chromosome8,突变基因为 *FOXG_02694*,所编码的蛋白是类似葡聚糖酶的蛋白质。其他 3 个突变体都是编码功能未知的假定蛋白。

3 讨论与结论

通过筛选棉花枯萎病菌 T-DNA 插入突变体库,可以发现与棉花枯萎病致病相关的基因,进而更好地理解 and 防治棉花枯萎病,为发现新的防治方法提供理论依据^[21-22]。一些研究人员也用此方法筛选出致病缺陷突变体,获得致病相关基因。例如, Dong 等^[23]通过筛选尖孢镰刀菌突变体库获得了 5 个致病基因。袁洪波等^[24]筛选出了 3 个致病力减弱的突变体,为揭示梨树腐烂病的致病分子机理打下了基础。这些研究为进一步了解棉花枯萎病的致病机制提供了

重要参考。

本研究通过前期构建的枯萎病菌 T-DNA 突变体库^[19],对致病性缺陷突变体的筛选结果显示,39 个突变体致病力发生显著变化,17 个突变体致病力降低。选取致病力降低最严重的 5 个突变体进行表型测定,发现都发生了变化,这与张俊华等^[25]、皇甫海燕等^[26]在水稻立枯病原菌尖孢镰孢菌和油菜黑胫病菌中的研究结果一致,说明 T-DNA 的插入不仅影响枯萎病菌致病性减弱,还影响了枯萎病菌的生长发育。在本研究中采用了 Hi TAIL-PCR 技术,经过 3 轮 PCR 扩增克隆了 5 个致病力减弱突变体的侧翼序列。随后,在 Ensembl 数据库上进行 BLAST 比对分析,以确定插入位点。其中突变体 B-18 可能影响了泛素 C 端水酶(基因 *FOXG_05113*)的表达,其作用是维持蛋白的稳定和细胞的生理活动等^[27],并且它也参与了生命活动的调控,如细胞周期、增殖、基因表达等^[28]。突变体 B-22 可能影响了 *FOXG_02694* 基因的正常表达,该基因编码葡聚糖酶,葡聚糖酶已在多种真菌和细菌研究过,其作用是降解纤维素^[29-30]。

通过明确这 5 个致病力缺陷突变体的插入

位点,能够更深入地理解海岛棉枯萎病的发病机制,并为基因功能研究提供有价值的候选条件。此外,这项研究也为发现海岛棉枯萎病菌的新致病机制提供了可能性。

REFERENCES

- [1] 王泽华, 方香玲. 尖孢镰刀菌遗传多样性研究进展[J]. 中国草地学报, 2021, 43(5): 106-114.
WANG ZH, FANG XL. The research on genetic diversity of *Fusarium oxysporum*[J]. Chinese Journal of Grassland, 2021, 43(5): 106-114 (in Chinese).
- [2] PRIYANKA K, DUBEY SC, SINGH AK. Conventional and real-time PCR assays for specific detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in plants using intergenic spacer region-based marker[J]. Biologia, 2015, 70(3): 314-319.
- [3] LIDA Y, FUJIWARA K, YOSHIOKA Y, TSUGE T. Mutation of *FVSI*, encoding a protein with a sterile alpha motif domain, affects asexual reproduction in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 351(1): 104-112.
- [4] PORTAL GONZÁLEZ N, SOLER A, RIBADENEIRA C, SOLANO J, PORTIELES R, HERRERA ISLA L, COMPANIONI B, BORRAS-HIDALGO O, SANTOS BERMUDEZ R. Phytotoxic metabolites produce by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 629395.
- [5] LI JM, FOKKENS L, van DAM P, REP M. Related mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium oxysporum* determine host range on cucurbits[J]. Molecular Plant Pathology, 2020, 21(6): 761-776.
- [6] BURKHARDT A, HENRY PM, KOIKE ST, GORDON TR, MARTIN F. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* from infected strawberry plants[J]. Plant Disease, 2019, 103(5): 1006-1013.
- [7] 刘艳. 海岛棉枯萎病抗性相关基因的克隆及功能验证[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2013.
LIU Y. *Fusarium* wilt resistance related-gene cloning and functional analysis of *Gossypium barbadense* L.[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [8] 李继洋, 雷建峰, 代培红, 姚瑞, 曲延英, 陈全家, 李月, 刘晓东. 基于棉花 U6 启动子的海岛棉 CRISPR/Cas9 基因组编辑体系的建立[J]. 作物学报, 2018, 44(2): 227-235.
LI JY, LEI JF, DAI PH, YAO R, QU YY, CHEN QJ, LI Y, LIU XD. Establishment of CRISPR/Cas9 genome editing system based on *GbU6* promoters in cotton (*Gossypium barbadense* L.)[J]. Acta Agronomica Sinica, 2018, 44(2): 227-235 (in Chinese).
- [9] 陈威. 棉花高产高效栽培新技术[J]. 花卉, 2019(16): 296.
CHEN W. New techniques for high yield and high efficiency cultivation of cotton[J]. Flowers, 2019(16): 296 (in Chinese).
- [10] 姜善伟, 董合忠, 田晓莉, 田立文. 新疆棉花“矮、密、早”栽培历史、现状和展望[J]. 中国农业科学, 2021, 54(4): 720-732.
LOU SW, DONG HZ, TIAN XL, TIAN LW. The “short, dense and early” cultivation of cotton in Xinjiang: history, current situation and prospect[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(4): 720-732 (in Chinese).
- [11] 张贝, 安邦, 罗红丽. 橡胶树胶孢炭疽菌 T-DNA 插入突变体库的构建及插入位点分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(13): 4279-4284.
ZHANG B, AN B, LUO HL. Construction of transfer DNA insert mutant library and analysis of insertion site in *Colletotrichum gloeosporioides* from rubber[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(13): 4279-4284 (in Chinese).
- [12] MISHRA NC, TATUM EL. Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973, 70(12): 3875-3879.
- [13] MICHIELSE CB, HOOYKAAS PJ, van DEN HONDE CA, RAM AF. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. Current Genetics, 2005, 48(1): 1-17.
- [14] 陈志辉. 水稻 T-DNA 插入突变体库构建与利用及 *miRNA* 基因功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2015.
CHEN ZH. Generation and utilization of rice T-DNA insertional mutant library and function studies of *miRNA* genes[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [15] DENISOV Y, YARDEN O, FREEMAN S. The transcription factor SNT2 is involved in fungal respiration and reactive oxidative stress in *Fusarium oxysporum* and *Neurospora crassa*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2011, 76(2): 137-143.
- [16] LI MH, XIE XL, LIN XF, SHI JX, DING ZJ, LING JF, XI PG, ZHOU JN, LENG YQ, ZHONG SB, JIANG ZD. Functional characterization of the gene *FoOCHI*

- encoding a putative α -1,6-mannosyltransferase in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2014, 65: 1-13.
- [17] RAMOS B, ALVES-SANTOS FM, GARCÍA-SÁNCHEZ MA, MARTÍN-RODRIGUES N, ESLAVA AP, DÍAZ-MÍNGUEZ JM. The gene coding for a new transcription factor (ftf1) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean[J]. Fungal Genetics and Biology, 2007, 44(9): 864-876.
- [18] MATHYS H, BASQUIN J, OZGUR S, CZARNOCKI-CIECIURA M, BONNEAU F, AARTSE A, DZIEMBOWSKI A, NOWOTNY M, CONTI E, FILIPOWICZ W. Structural and biochemical insights to the role of the CCR4-NOT complex and DDX6 ATPase in microRNA repression[J]. Molecular Cell, 2014, 54(5): 751-765.
- [19] 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 Y, GU AX, ZHU Q. Construction and analysis of mutant library of cotton *Fusarium wilt*[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 125-138 (in Chinese).
- [20] LIU YG, CHEN YL. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. BioTechniques, 2007, 43(5): 649-650, 652, 654.
- [21] 何丽云, 张树林, 崔百元, 朱庆峰, 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).
- [22] 李杰, 李硕然, 张谷楠, 汪天虹, 钟耀华, 赵宁. 农杆菌介导 *pepA* 基因对黑曲霉菌丝体的遗传转化[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(5): 29-35, F0002.
LI J, LI SR, ZHANG GN, WANG TH, ZHONG YH, ZHAO N. Genetic transformation of *pepA* gene to *Aspergillus niger* mycelium via *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44(5): 29-35, F0002 (in Chinese).
- [23] DONG YH, MENG XL, WANG YN, HU TL, WANG ST, CAO KQ. Screening of pathogenicity-deficient *Fusarium oxysporum* mutants established by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2021, 43(1): 140-154.
- [24] 袁洪波, 侯琿, 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 HB, HOU H, ZHOU ZQ, TU HT, 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).
- [25] 张俊华, 杨松润, 彭莉莉, 王亮, 杨明秀, 徐晓凤, 倪哲, 李培宁. 水稻立枯病原菌尖孢镰孢菌致病力降低 T-DNA 突变体的筛选与插入位点鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2022, 53(11): 10-18.
ZHANG JH, YANG SR, PENG LL, WANG L, YANG MX, XU XF, NI Z, LI PN. Screening and insertion site identification of T-DNA mutants with reduced pathogenicity of *Fusarium oxysporum* Schelcht[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2022, 53(11): 10-18 (in Chinese).
- [26] 皇甫海燕, 史志丹, 郝丽芬, 燕孟娇, 宋培玲, 杨永青, 贾晓清, 皇甫九茹, 郭晨, 李子钦. 油菜黑胫病菌 T-DNA 插入致病力减弱突变体的筛选及侧翼序列分析[J]. 华北农学报, 2021, 36(1): 197-202.
HUANGFU HY, SHI ZD, HAO LF, YAN MJ, SONG PL, YANG YQ, JIA XQ, HUANGFU JR, GUO C, LI ZQ. Screening of the T-DNA insertional pathogenicity defect mutants and analysis of flanking sequence in *Leptosphaeria biglobosa*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2021, 36(1): 197-202 (in Chinese).
- [27] FRAILE JM, QUESADA V, RODRÍGUEZ D, FREIJE JMP, LÓPEZ-OTÍN C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options[J]. Oncogene, 2012, 31(19): 2373-2388.
- [28] OHTAKE F, TSUCHIYA H, SAEKI Y, TANAKA K. K63 ubiquitylation triggers proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(7): E1401-E1408.
- [29] TSAI PW, YANG CY, CHANG HT, LAN CY. Characterizing the role of cell-wall β -1,3-exoglucanase Xog1p in *Candida albicans* adhesion by the human antimicrobial peptide LL-37[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21394.
- [30] ZHAO XH, WANG W, WANG FQ, WEI DZ. A comparative study of β -1,4-endoglucanase (possessing β -1,4-exoglucanase activity) from *Bacillus subtilis* LH expressed in *Pichia pastoris* GS115 and *Escherichia coli* Rosetta(DE3)[J]. Bioresource Technology, 2012, 110: 539-545.