



专论与综述

丝状真菌遗传筛选系统的研究及其应用

邓大杰¹ 孟亚南^{1,3} 邓二杰^{1,2} 董金皋^{*1,3} 曾凡力^{*1}

1 河北农业大学生命科学学院 河北 保定 071001

2 河北农业大学食品科技学院 河北 保定 071001

3 河北省植物生理与病理学重点实验室 河北 保定 071001

摘要: 随着基因组时代的发展,主要丝状真菌基因组测序基本完成而被广泛应用于工业、农业、医药等领域。然而丝状真菌的遗传转化效率极低,为了保证在大量非转化子背景下能筛选到目标转化子,恰当的筛选标记显得尤为重要。目前,在丝状真菌的遗传转化过程中常用的筛选标记可分为两类:药物抗性筛选标记和营养缺陷型筛选标记。但两者均具有一定的局限性,为此科研人员利用最新研究的基因组编辑技术对筛选标记加以修饰改造,以更好地用于遗传筛选。本文综述了目前常用的遗传筛选系统的分子机制及运用基因组编辑技术改造的新型筛选标记理论,为丝状真菌在各领域更广泛的应用奠定基础。

关键词: 丝状真菌, 筛选标记, 营养筛选, 抗性筛选, 基因组编辑

Application of genetic selection system in filamentous fungi: a review

DENG Da-Jie¹ MENG Ya-Nan^{1,3} DENG Er-Jie^{1,2} DONG Jin-Gao^{*1,3} ZENG Fan-Li^{*1}

1 College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001, China

2 College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001, China

3 Key Laboratory of Plant Physiology and Pathology in Hebei Province, Baoding, Hebei 071001, China

Abstract: With the booming of the genome era, the whole genome sequencing of important filamentous fungi has been basically completed and is widely used in the fields of industry, agriculture and medicine. However, the genetic transformation efficiency of filamentous fungi is extremely low. In order to ensure that positive transformants can be picked out from a large number of non-transformed colonies. Therefore

Foundation items: National Modern Agriculture Industry Technique Systems (CARS-02); Starting Grant from Hebei Agricultural University (3002001); Biotechnology Professional Comprehensive Reform Pilot Project of Department of Education of Hebei Province (201202); Research on the Professional Construction of Biotechnology in the Education Department of Hebei Province (2012GJJG054); College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program of Hebei Agricultural University (201810086020)

***Corresponding authors:** DONG Jin-Gao: Tel: 86-312-7521823; E-mail: dongjingao@126.com

ZENG Fan-Li: Tel: 86-312-7528593; E-mail: shmzfl@hebau.edu.cn

Received: 02-07-2018; **Accepted:** 06-12-2018; **Published online:** 27-12-2018

基金项目: 国家现代玉米产业体系(CARS-02); 河北农业大学科技发展基金(3002001); 教育部、河北省教育厅“生物技术”专业综合改革试点项目(201202); 河北省教育厅课题“生物技术”品牌特色专业建设研究(2012GJJG054); 河北农业大学大学生创新创业训练计划资助项目(201810086020)

***通信作者:** 董金皋: Tel: 0312-7521823; E-mail: dongjingao@126.com

曾凡力: Tel: 0312-7528593; E-mail: shmzfl@hebau.edu.cn

收稿日期: 2018-07-02; **接受日期:** 2018-12-06; **网络首发日期:** 2018-12-27

appropriate selectable markers are particularly important. At present, the commonly used selectable markers in the genetic transformation of filamentous fungi can be divided into two categories: drug-resistance selectable markers and auxotrophic selectable markers. However, both of them have distinct limitations. For this reason, researchers use the latest genome editing technology to modify the selectable markers for better genetic selection. This article reviews the current genetic selection system and new screening marker theory modified by genome editing technology, which lays a foundation for a broader application prospect of filamentous fungi in various fields.

Keywords: Filamentous fungi, Selectable marker, Auxotrophic selection, Drug-resistant selection, Genomic editing

丝状真菌(Filamentous fungi)是一类重要的真核微生物,广泛存在于自然界中,并在工业、农业和医药等领域发挥着重要作用。例如,里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)被广泛用于生产工业酶制剂(如纤维素酶、葡萄糖淀粉酶和淀粉酶等)和有机酸(如柠檬酸等)。与细菌、酵母相比,丝状真菌具有较高的蛋白质分泌能力。例如,传统诱变后的里氏木霉经发酵工艺优化后,自身纤维素酶分泌水平可达 40 g/L,甚至更高^[1]。而且它还具有转运分泌蛋白到胞外的能力,这对蛋白产物的分离纯化非常有利;目前仅有几种酵母菌的分泌蛋白可达到 g/L 级的水平^[2],而黑曲霉分泌的葡萄糖淀粉酶水平可达 25–30 g/L^[3]。因此,丝状真菌作为细胞工厂生产外源蛋白也受到广泛关注。除此之外,黑曲霉也是柠檬酸工业化生产的主要发酵菌株,并有科研人员成功构建由原生质体-PEG 介导的高产柠檬酸黑曲霉菌株的遗传转化体系,为柠檬酸工业化发展提供可能^[4]。农业上,丝状真菌一方面会引起农作物病害,如引起水稻稻瘟病的病原真菌——稻瘟菌(*Magnaporthe grisea*)可侵染多种禾本科植物;另一方面则具有生物防治和土壤修复功能,木霉属具有产生多种抗生素物质的能力以及寄生其他真菌的能力,如绿色木霉(*Trichoderma viride*)和哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)可诱导一系列植物产生对多种植物病原体局部和系统的抗性。当其孢子添加到土壤中时,它们与植物根部接触并在根表面上发芽和生长,同时会产生引发植物防御反应的化合物,除此之外,还可以增加养分吸收和氮利用效率,

溶解土壤中的养分,起到修复的作用^[5]。医药上,临床上广泛使用的抗生素——青霉素和头孢菌素分别由产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)和顶头孢霉(*Cephalosporium acremonium*)产生。

在现代生物技术不断发展的今天,遗传操作体系的建立对丝状真菌在各领域的进一步发展具有重要意义。构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)和粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)等因结构相对简单而被作为真核微生物的“模式”菌在基础研究领域发挥着不可替代的作用。1979 年首次将 DNA 重组技术应用于粗糙脉孢菌,这对丝状真菌产物形成的分子基础研究及代谢工程育种具有重大意义^[6]。但大多数非模式丝状真菌的分子遗传学基础研究尚不明确。近年来,1 000 个真菌基因组计划的完成(<http://genome.jgi.doe.gov/>)为非模式丝状真菌的研究提供更有力的手段^[7]。在功能基因组时代,从分子遗传水平上深入研究丝状真菌,尽可能发挥其在工业、农业、医药及基础生物研究等方面的作用,对其遗传转化的研究是十分必要的。

自 1973 年 Mishra 等利用肌醇缺陷型(inl⁻)粗糙脉孢菌进行转化实验以来^[8],尤其近 10 年,丝状真菌遗传转化系统研究发展迅速。据统计,到目前为止已在 100 多种丝状真菌中成功进行了转化^[9]。我们课题组长期从事于玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、谷子弯孢菌(*Cochliobolus lunatus*)、粟弯孢霉叶斑病菌(*Curvularia lunata*)等丝状真菌在生长、发育及致病性机理相关基因的研究。如构建玉米大斑病菌的漆酶基因 *Stlac2* 敲除突变体,发现该基因参与细胞壁完整性,

黑色素生物合成以及附着体和分生孢子形成的重要过程^[10]; 构建灰葡萄孢致病相关基因的 RNAi 突变体, 探究病菌侵染与致病的分子机制, 为制定持久控制灰霉病提供理论依据及实验基础^[11-12]; 利用 RACE 技术成功克隆谷子弯孢病菌中编码海藻糖酶基因——*citre* 基因, 研究发现该基因参与病菌生长发育及致病过程, 为以海藻糖酶为靶位点的化学农药防控研究奠定基础^[13]; 粟弯孢霉叶斑病是由新月弯孢病菌引起的一种重要谷子叶部病害, 通过粟弯孢霉叶斑病菌致病相关基因的克隆和功能分析, 对致病机制及防御具有重要指导意义^[14]。然而在基因转化过程中, 为保证从大量非转化子背景下能快速筛选到目标转化子或在转化子纯培养过程中避免重组基因的丢失, 必须依赖于特异性筛选标记基因, 使其在特定的生长压力下得到选择性培养^[15]。

筛选标记基因可使转化子获得自身所不具备的新的遗传特性; 是遗传转化载体所必备的基本元件; 是利用特定的选择培养基筛选转化子的一类特殊标记基因。目前, 常见的筛选标记主要分三类: 第一类为营养筛选, 包括氮源和碳源营养基因及营养缺陷型互补型标记基因, 通过转入的标记基因与受体菌突变基因互补, 使受体菌恢复野生型; 第二类为药物抗性标记基因, 该基因的转入使受体菌在一定药物浓度下正常生长, 表现药物抗性; 第三类是功能附加型筛选标记, 因质粒携带宿主细胞本身没有的基因而赋予转化子新的基因功能, 进行特异性筛选。

1 营养筛选

营养筛选是因营养缺陷型菌株合成或分解代谢途径异常而通过外源物质补救进行遗传转化筛选的方式。营养缺陷型菌株是指经自然或人为突变致使代谢途径中某一过程发生缺陷, 丧失合成某种物质的能力, 需外源添加该营养物质才能正常生长的突变菌株。目前常用的营养筛选分为两类: 第一类是氮源和碳源营养基因; 第二类是营养缺陷型互补基因。氮源和碳源营养基因标记在受体菌染色体中无同源序列, 将标记基因插入到受体菌染色体的

特定位点产生突变型表达, 结果显示只有转化子能够在含特定氮源或碳源培养基上正常生长, 野生型则不能。此类应用较为广泛的有: *amdS*、*niaD*、*glmS* 基因等。营养缺陷型互补基因是通过转入的标记基因与相应营养缺陷型菌株遗传互补恢复正常生长, 为转化子提供一种正向选择。此类应用最为广泛的有 *pyrG*、*trpC*、*agaA* 及 *argB* 基因等。

1.1 氮源和碳源营养基因

1.1.1 *amdS* 氮源营养筛选基因

构巢曲霉中 *amdS* 基因编码的乙酰胺酶能将乙酰胺降解成氨从而获得其生长所需氮源, 而黑曲霉、产黄青霉及其它丝状真菌则不能合成此酶, 即没有能力利用乙酰胺。为此, 它们只有从载体上获得乙酰胺基因来表达乙酰胺酶, 才能在以乙酰胺作为唯一氮源的培养基上正常生长, 而不含 *amdS* 的野生型则生长较差, 实现转化子筛选^[16]。因此, *amdS* 基因是大多数丝状真菌(除构巢曲霉)转化很好的筛选标记。

1.1.2 *niaD* 氮源营养筛选基因

niaD 编码的硝酸盐还原酶是真菌氮素代谢过程中的关键酶, 可使转化子获得硝酸盐代谢能力。真菌吸收并利用外界 NO_3^- 需经过 2 个同化反应: 首先 NO_3^- 经硝酸还原酶还原为 NO_2^- , 再经亚硝酸还原酶还原为 NH_4^+ , 进一步利用氮源完成氨基酸及蛋白质的合成。同化反应中两个酶易受外界条件影响导致基因功能缺失, 使微生物不能利用硝酸盐。但 *niaD* 功能缺失的突变株能耐受高浓度的氯酸盐^[17], 而野生型则不能。因此, 通过氯酸盐的选择易获得 *niaD* 自然突变株可用于转化子的筛选。该筛选基因遗传上比较稳定、对环境无污染、成本较低、为诱导型基因, 便于遗传操作, 而被广泛用于转化米曲霉、产黄青霉、黑曲霉等重要的工业丝状真菌。

1.1.3 *glmS* 碳源营养筛选基因

glmS 基因编码的葡萄糖胺合成酶参与催化氨基己糖合成代谢途径的第一步反应, 即氨基在谷氨酰胺和 6-磷酸果糖之间转移产生 6-磷酸葡萄糖胺, 因而又称谷氨酰胺-6-磷酸果糖氨基转移酶^[18-19]。该酶几乎存在于每个物种中, 是生命活动所必需的

酶。因此,敲除 *glmS* 的宿主菌株只有在外源添加葡萄糖胺为碳源的培养基上才能正常生长。

1.2 营养缺陷型筛选

1.2.1 尿嘧啶营养缺陷型筛选

1979年,Botstein和Struhl等运用DNA重组技术从酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中首次得到编码乳清苷-5'-磷酸脱羧酶的 *ura3* 基因,并将其作为选择标记构建酿酒酵母转化系统^[20-21]。1984年,Boeke等发现在酿酒酵母中敲除 *ura3* 基因可形成尿嘧啶营养缺陷型菌株^[22]。*ura3* 基因编码的乳清苷-5'-磷酸脱羧酶是酵母尿嘧啶核苷酸合成过程中的关键酶,敲除该基因乳清苷-5'-磷酸脱羧酶失活,表现为尿苷或尿嘧啶营养缺陷,只能在添加尿苷或尿嘧啶的培养基上生长。

尿嘧啶生物合成途径非常保守,在丝状真菌中也具有类似的生化反应^[23]。黑曲霉中 *pyrG/pyr4* 基因,米曲霉中的 *pyrF* 基因与酿酒酵母 *ura3* 基因均同源,其编码的产物乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶或乳清酸磷酸核糖转移酶是负责乳清苷-5'-磷酸向尿嘧啶生物合成途径中的最后一步尿苷-5'-磷酸转化的酶;敲除 *pyrG* 基因使乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶失活,菌株无法合成尿嘧啶。对于尿苷和尿嘧啶营养缺陷型菌株,则需通过外源补加尿嘧啶进行补救途径。

1.2.2 色氨酸营养缺陷型筛选

L-色氨酸是丝状真菌生长的必需氨基酸之一,但它们不能自身代谢合成,需从外界环境中摄取才能满足其营养物质的需求。色氨酸操纵子由5个结构基因组成: *trp1*、*trp2*、*trp3*、*trp4* 和 *trp5*。*trp1* 基因和 *trp2* 基因是在色氨酸的合成中编码色氨酸合成酶的2个亚基^[24],*trp3* 基因编码吡咯-3-甘油磷酸合成酶,*trp4* 基因和 *trp5* 基因是编码邻氨基苯甲酸合成酶的2个亚基^[25]。邻氨基苯甲酸合成酶催化由分支酸生成N-氨基苯甲酸,吡咯-3-甘油磷酸合成酶催化N-氨基苯甲酸生成吡咯-3-甘油磷酸,色氨酸合成酶催化最后一步反应生成色氨酸^[26]。沈微等在研究产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes* WL2002-5)的多基因敲除过程中发现磷酸核糖氨基苯甲酸同分

异构酶催化由分支酸到色氨酸的生物合成途径的第3步,因其编码基因 *trp1* 突变而产生的 *trp1* 缺陷型突变株相对容易获得,且该基因又能有效互补宿主酵母的 *trp1* 缺陷,因此 *trp1* 基因常用作酵母遗传工程中的标记基因^[27-30]。该基因同样可以作为丝状真菌的营养筛选标记。1988年,Kim等在粗糙脉孢菌中敲除 *trp1* 基因引起菌株的整个色氨酸合成功能障碍,使其不能正常合成色氨酸,导致色氨酸营养缺陷,即在色氨酸缺陷培养基内不能生长^[31]。黑曲霉和产黄青霉的 *trpC* 基因类似于粗糙脉孢菌 *trp1* 基因,该营养筛选系统已被广泛应用于丝状真菌^[32-33]。

1.2.3 精氨酸酶营养缺陷型筛选

agaA 基因编码精氨酸酶参与精氨酸转变为鸟氨酸的代谢过程。2012年,Dave等敲除黑曲霉 *agaA* 基因得到精氨酸酶营养缺陷型菌株,并发现2种不同的启动子启动 *agaA* 回补基因,得到正常生长的菌株^[34]。当 *agaA* 基因缺失时,菌株因无法利用精氨酸合成鸟氨酸而成为营养缺陷型宿主菌。当外源载体带有 *agaA* 基因转化该营养缺陷型菌株,转化子可恢复代谢精氨酸转化为鸟氨酸的能力,即在补加精氨酸的培养基中正常生长^[34]。但该筛选基因目前应用范围较小,目前只在黑曲霉丝状真菌应用成功。

1.2.4 精氨酸营养缺陷型筛选

argB 基因编码的鸟氨酸氨甲酰基转移酶催化鸟氨酸转化为精氨酸的过程,参与尿素的合成。敲除 *argB* 基因引起胞内精氨酸缺少导致不能在基本培养基中生长,外源添加精氨酸或瓜氨酸,可使突变株正常生长^[35-36]。体外构建 *argB* 基因载体转化到 *argB* 营养缺陷型菌株营养缺陷互补,以实现其他基因遗传筛选的目的。

1.3 致突变型或建立特殊代谢途径的标记

营养缺陷型菌株被广泛应用于分子生物学实验,但经突变产生的营养缺陷型菌株不稳定,易回复为野生型,影响转化子的筛选。因为 *amdS* 和 *pyrG* 的正向和反向筛选的特异性,使之在多基因敲除过程中成为了丝状真菌较为常用的筛选标记。

在 *pyrG* 营养缺陷型筛选的基础上进行改善, 发现了一种反筛选药物——5-氟乳清酸(5-FOA), 它几乎对所有生物体都有毒性, 是乳清酸的结构类似物, 可代替乳清酸进入嘧啶合成通路, 在乳清酸核苷-5'-单磷酸脱羧酶、胸苷酸合成酶等一系列酶作用下产生对细胞有毒性的物质, 导致细胞死亡^[37]。在研究该药物的同时发现该药物与尿嘧啶的生物合成过程有着密切的关系: 在外源添加尿嘧啶满足生长需要的情况下, 阻断嘧啶合成通路可使细胞对 5-FOA 产生抗性^[38-40], 为此, 这可以作为尿嘧啶缺陷型筛选的依据。由 *pyrG* 基因编码的乳清酸核苷-5'-单磷酸脱羧酶, 不仅是尿嘧啶合成过程中的关键酶之一^[41], 它也可以催化 5-FOA 合成有毒的 5-氟尿嘧啶单磷酸盐^[23], 产生很强的细胞毒性, 导致野生株在含有 5-FOA 的培养基中不能完成尿嘧啶营养物的合成, 生长受到抑制^[42]; 但对于尿嘧啶营养缺陷型菌株缺失尿嘧啶核苷酸从头合成途径中的乳清酸磷酸核糖转移酶或乳清酸核苷单磷酸盐脱羧酶, 使 5-FOA 无法形成有毒物质 5-氟尿嘧啶单磷酸盐, 从而对 5-FOA 具有抗性^[22], 其嘧啶核苷酸的营养则可以向培养基加入尿嘧啶通过补救途径给予补充; 而 5-FOA 可以抑制野生型生长。因此在含尿嘧啶的培养基中加入 5-FOA 可用于尿嘧啶营养缺陷型突变体的反筛, 其筛选效率大大提高, 并且减少了回复率。

构建反向筛选系统的实际操作过程也非常简单, 将携带有构巢曲霉的 *pyrG* 基因的部分片段的质粒, 转化构巢曲霉可造成乳清酸核苷-5'-单磷酸脱羧酶功能的缺失, 通过 5-FOA 反筛可得到转化子。另外, 在构巢曲霉中已成功运用 5-FOA 反筛的方法构建 *yA* 和 *wA* 突变体^[7]。目前, 我们课题组也将 5-FOA 反筛的方法成功用于玉米大斑病菌的遗传转化筛选。

最初丝状真菌转化子的获取多是利用营养筛选, 其中营养缺陷型标记易于筛选。但是, 特定营养缺陷型菌株的获取是大多数丝状真菌难以满足的, 并且经突变产生的营养缺陷型菌株不稳定, 易回复成野生型^[43], 严重阻碍了对丝状真菌的遗传工

程改造。所以, 抗性筛选在遗传转化中显得尤为重要: 可直接用野生型菌株完成转化和筛选, 无需特定的营养缺陷型菌株。

2 抗性筛选

抗性筛选是将抗性基因转入受体菌中使其在一定药物浓度下生长而表现抗药性的一类筛选方式。目前常用的抗性筛选标记基因分为抗生素抗性基因和除草剂抗性基因两类。抗生素类药物对细胞生长的抑制作用主要在于影响细胞壁的形成和细胞膜的功能、抑制核酸或蛋白质的生物合成^[44]。常用的抗生素包括潮霉素、遗传霉素、寡霉素、博来霉素及苯菌灵。除草剂类药物主要作用于除草剂的有效成分使其丧失活性, 如草胺磷。

选择抗生素或除草剂的种类和浓度一般要求既要能有效抑制非转化子的生长又不影响转化子的正常生长。由于不同受体菌对不同种类和浓度的抗生素或除草剂敏感程度及毒害耐受程度存在较大差异, 因此确定适宜的选择抗生素或除草剂种类和浓度对筛选转化子至关重要。

2.1 抗生素抗性基因筛选

2.1.1 潮霉素抗性筛选

潮霉素磷酸转移酶基因产物的作用底物潮霉素 B (Hygromycin B) 是由吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)产生的抑制原核和真核生物蛋白质合成的氨基糖苷类抗生素^[45], 可破坏细胞核中核糖体的功能, 导致基因翻译受阻, 蛋白质合成受到抑制。潮霉素磷酸转移酶可将磷酸基团共价地加到潮霉素 B 的第 4 位羟基上, 发生磷酸化而失去活性, 使受体菌产生潮霉素抗性。1988 年, Wang 等构建了含有潮霉素磷酸转移酶基因的质粒载体 pHL1 转化致病真菌——黑粉菌(*Ustilago maydis*)获得了具有潮霉素抗性的转化子^[46]。1989 年, Punt 等构建了来源于构巢曲霉的强三磷酸甘油醛脱氢酶启动子调控下的潮霉素磷酸转移酶基因的质粒载体 pAN7-1^[47]。目前, pAN7-1 常被用作丝状真菌的整合转化并获得理想的效果^[48]。近些年, 我们课题组

利用潮霉素抗性筛选灰葡萄孢的 T-DNA 插入突变体库, 获得了一株致病力增强的突变体 BCt98, 为研究灰葡萄孢侵染及致病机理奠定基础^[49-50]。多数真菌对潮霉素 B 较其他抗生素表现出更高的敏感性, 尽管一些真菌种类需要较高的潮霉素 B 的浓度来抑制其生长, 但在浓度 50–400 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内可以抑制大多数真核微生物的生长^[51]。

2.1.2 新霉素抗性筛选

新霉素(Neomycin)抗性基因 *neo^r* 编码氨基糖苷磷酸转移酶, 该酶可使氨基糖苷抗生素 G418 (新霉素衍生物)失活。G418 通过抑制 80S 核糖体的功能来阻断蛋白质的合成进而杀死细胞^[52]。当 *neo* 基因被整合到基因组后, 则能启动 *neo* 基因编码的序列转录为 mRNA, 以获得抗性产物氨基糖苷磷酸转移酶的高效表达, 使细胞获得抗性而能在含有 G418 的选择性培养基中生长。*neo* 抗性基因序列较短, 易获取。因此, G418 抗性筛选系统已被广泛地用作丝状真菌转化。

据报道, 为给谢瓦氏曲霉间型变种(*Aspergillus chevalieri* var. *intermedius*)多基因功能的研究提供新的选择标记, 采用构巢曲霉三磷酸甘油醛脱氢酶基因启动子 *PgpdA*、*nprII* 基因和构巢曲霉色氨酸 C 终止子 *TtrpC* 组成的 G418 抗性基因替换双元载体 pDHT/sk-bar 上的草丁膦抗性, 成功构建双元载体 pDHT/sk-nt, 并且通过根癌农杆菌介导的转化获得 G418 抗性转化子^[53]。

2.1.3 寡霉素抗性筛选

寡霉素(Oligomycin)抗生素是由 Smith 等首次从淀粉酶产色链霉菌(*Streptomyces diastatochromogenes*)中分离得到的一类结构相似的二十六元环大环内酯类抗体络合物^[54], 是一种醇溶性的结晶, 具有强烈的抗肿瘤、抗真菌、呼吸抑制作用及杀虫等生物学活性, 被广泛应用于科学研究。1958 年, Lardy 等报道寡霉素是线粒体 ATP 合酶参与氧化磷酸化能量转移的有效抑制剂之一^[55]。20 世纪 60 年代, Racker 等研究表明, 线粒体 ATP 合酶可分为两部分, 耦合因子 F_1 和 F_0 , 前者含有 ATP 合成的催化

位点而后者可产生寡霉素抗性^[56-58]。寡霉素与 F_0 结合可特异地抑制氢的运输, 直接干扰 ATP 的生成过程。目前, 寡霉素的抗性蛋白常用于筛选对这种抗生素敏感的丝状真菌的转化子。研究发现构巢曲霉和黑曲霉的 *oliC31* 和 *oliC3* 基因编码线粒体 ATP 合酶亚基 9 的抗寡霉素变体, 将其基因转化构巢曲霉和黑曲霉后, 可直接选择寡霉素抗性^[59-60]。即在含有寡霉素的培养基中筛选到的抗性转化子。但寡霉素抗性作为一种半显性抗性具有种的特性, 其应用受到一定限制。

2.1.4 博来霉素抗性筛选

博来霉素(Bleomycin, BLM)是 1966 年从轮枝链霉菌(*Streptomyces verticillus*)分离出的一种碱性水溶性糖肽类抗肿瘤抗生素。*blmVIII* 编码一个聚酮合成酶, 其由 1 个酮基合成酶、1 个酰基转移酶、1 个甲基转移酶等多个功能域组成^[61], 采用 λ RED 介导的 PCR 定向突变使轮枝链霉菌中的 *blmVIII* 基因缺失, 丧失了合成 BLM 的能力, 说明 *blmVIII* 是 BLM 生物合成的过程中必不可少的基因^[62]。*blmC*、*blmD*、*blmE*、*blmF*、*blmH*、*blmG* 被鉴定为糖基生物合成基因, 负责 BLM 中相应糖基的合成。*blmA* 和 *blmB* 是编码 BLM 结合蛋白的基因, 有可能负责产生自身对 BLM 的抗性。X 射线晶体结构测定表明 *blmA* 通过 N 末端臂交换形成二聚体^[63], 推测 *blmA* 和 BLM 可能通过碱性抗生素与酸性蛋白之间的静电而相互作用, 在 Fe^{2+} 的螯合作用下, 它们的亲和力大大提高, 通过药物隔离使得轮枝链霉菌自身产生抗药性^[64]。BLMB 是 BLM 的一个 N-乙酰转移酶, 在乙酰辅酶 A 的作用下, N-乙酰化修饰 BLM 中的 β -氨基丙胺酰胺的伯胺, 其对金属离子结合是非常关键的, 乙酰化的 BLM 将不能螯合金属离子而失活^[65]。因此, 敲除与 BLM 生物合成相关的一个必需基因, 就会导致菌株在含有博来霉素抗生素的培养基中死亡以达到筛选的作用。

2.1.5 苯菌灵抗性筛选

苯菌灵(Benomyl)属于苯并咪唑类杀菌剂, 该类杀菌剂主要作用于病原菌的 β -微管蛋白, 阻止纺锤

丝的形成, 干扰细胞核的分裂, 对子囊菌亚门、半知菌亚门及部分担子菌亚门真菌引起的病害有很好的防治效果。2007 年, Avenot 等研究发现苯菌灵能使构巢曲霉的核不稳定, 推测苯并咪唑类药剂可以干扰病原菌的核酸物质的合成^[66]。但后来的研究表明^[67-69], 该类杀菌剂可以使细胞核的分裂受阻, 而抑制核酸物质的合成只是核分裂受阻的结果。大多数病原真菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗性是由 β -微管蛋白基因控制的, 该基因不同的碱基发生突变或同一碱基发生不同的突变均可使病原真菌产生不同的抗药性。但这类药物作用位点单一, 选择性较强, 病原菌在药物选择压力下很容易产生抗药性。因此, 苯并咪唑类杀菌剂的应用范围及前景受到一定限制。

2.2 除草剂抗性筛选

吸水链霉菌中的 *bar* 基因编码膦丝菌素乙酰转移酶, 通过乙酰化作用使除草剂的有效成分膦丝菌素失去毒性。现广泛应用于农业生产的除草剂是草胺膦(Phosphinothricin), 其抗性筛选是利用草胺膦对丝状真菌细胞内的谷氨酰胺合成酶的抑制作用而起到筛选效果的。而谷氨酰胺合成酶对细胞内氮同化吸收以及氮代谢具有重要作用, 广泛存在于高等植物和微生物细胞内。大肠杆菌谷氨酰胺合成酶的体外抑制实验表明, ATP 可使草胺膦磷酸化成为该酶不可逆的非共价抑制剂^[70], 经过磷酸化的草胺膦与谷氨酰胺合成酶生成一种复杂的化合物^[71]。1989 年, Avalos 等用 *bar* 基因作为草胺膦抗性基因筛选标记在粗糙脉孢菌中敲除基因^[72]。表达 *bar* 基因的转化子在经受致死剂量的膦丝菌素处理后仍能正常生长, 而草胺膦可抑制谷氨酰胺合成酶的活性, 导致敏感的非转化子发生氨的致死性累积, 迅速停止生长。2014 年, 我们课题组通过草胺膦抗性筛选获得表达灰葡萄孢犬尿氨酸单氧酶的转化子, 为研究其功能奠定了重要基础^[73]。科研人员普遍认为草胺膦抗性基因是丝状真菌遗传转化中较为理想的筛选标记。我们实验室在玉米大斑病菌, 灰葡萄孢等遗传转化中发现草胺膦抗性筛选基因本身

对菌落形态没有影响, 与野生型保持一致。同时我们课题组在玉米大斑病菌研究过程中发现利用草胺膦抗性筛选是多个筛选标记中较为理想的, 未观察到对菌体生长形态的影响。而潮霉素抗性筛选过程中, 我们发现高浓度潮霉素药物一定程度上会增加基因组随机突变率。

草胺膦是一种广谱除草剂, 几乎无土壤残留^[74]。因其价格低廉, 在农业生产中应用广泛。抗除草剂基因筛选系统作用灵敏, 假阳性低且增加作物优良性状, 越来越多地应用于植物遗传转化^[75]。其中 *bar* 基因是应用最广的除草剂抗性筛选标记基因。该抗性筛选系统操作简单, 但每个菌种对草胺膦浓度的敏感性不同, 如镰孢霉菌(*Neurospora*)对草胺膦敏感性很低, 需要加到 6 000 $\mu\text{g/mL}$ 才能抑制生长; 而大豆紫斑病菌(*Cercospora kikuchii*)对草胺膦很敏感, 只需在培养基中添加 0.50 $\mu\text{g/mL}$ 就可以完全抑制其生长, 并且遗传转化中使用的抗除草剂筛选系统也有可能改变生物的遗传多样性, 造成生态危害。

2.3 抗性筛选基因的应用

目前, 抗性基因已被广泛用作外源基因构建适用于丝状真菌的遗传转化的表达载体, 进而通过异源基因的表达筛选目标转化子, 利于丝状真菌基因敲除及功能的研究。如 2003 年, 汪天虹等成功构建含有瑞氏木霉外切葡聚糖纤维二糖水解酶 1 (*cbhl*) 启动子和终止子序列的整合型强表达载体 pTRIL。同时将外源基因和潮霉素磷酸转移酶基因 *hph* 插入 pTRIL 上, 通过同源或异源整合到瑞氏木霉染色体上, 使外源基因在瑞氏木霉 *cbhl* 启动子控制下得到高效表达, 研究发现转化子对潮霉素的抗性有大幅度提高, 为深入开展瑞氏木霉分子生物学基础理论与应用研究奠定了基础^[76]。2014 年, 我们课题组在灰葡萄孢中利用 PEG 介导的原生质体转化方法, 将构建好的 pBARKS1-BcKMO-eGFP 载体转化突变体 BCG183 的原生质体, 用草胺膦筛选获得抗性稳定的灰葡萄孢 BcKMO 回复突变体^[73]。

同样, 抗性基因在基因定向敲除中也起着重要

作用。通过同源重组将抗性基因定向替换目的基因以实现基因定向敲除。2012年,李海娇等构建基因定向敲除结构(待敲除基因的上游同源序列-抗性基因-下游同源序列)采用PEG介导的原生质体转化或农杆菌介导的遗传转化法转化丝状真菌,利用抗性基因筛选获得定向敲除的菌株。在稻瘟病菌、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、灰葡萄孢等多种丝状真菌单个基因的功能或多个基因的联合作用的研究起到重要作用^[77]。2014年,唐俊等首次将G418抗性筛选标记在深绿木霉菌(*Trichoderma atroviride*)中应用:构建以G418抗性为筛选标记的质粒载体p1300-neo,并将该质粒通过农杆菌转化深绿木霉T23菌株,利用G418抗性平板筛选获得转化子^[98]。研究表明,野生木霉菌对G418具有高度敏感性,有利于高效筛选获得木霉菌突变株,G418抗性标记为木霉菌突变体的筛选、基因定向敲除及功能研究等提供了一个既经济又相对高效的工具,也可将其应用于其他丝状真菌的遗传研究^[78]。

抗生素标记对受体菌无特殊要求,可直接用作转化,操作方便,但使用药物筛选易导致菌株产生耐药性,而且选择培养基中用于筛选转化子的药物大多都比较昂贵。总之,抗性筛选也并非最好的遗传转化筛选的方法。

3 功能附加型筛选标记

目前除通过敲除氨基酸、核苷酸或糖代谢途径相关基因构建营养缺陷型宿主菌株以外,研究人员还发展了功能附加型筛选标记,即用质粒携带宿主细胞本身没有的基因赋予转化子新的基因功能,然后在特定的选择压力下进行转化子的筛选。例如,甘露糖-6-磷酸异构酶(Mannose-6-phosphate isomerase)是来源于大肠杆菌的*manA*基因,当甘露糖存在的情况下,农杆菌细胞内的己糖激酶可催化甘露糖为甘露糖-6-磷酸,含有甘露糖-6-磷酸异构酶基因的质粒可将甘露糖-6-磷酸转化为果糖-6-磷酸。因此,当在培养基中只有甘露糖-6-磷酸作为唯一碳源时,只有含有甘露糖-6-磷酸异构酶基因的转化子方可生

长,而未转化部分因不能利用甘露糖-6-磷酸而停止生长^[79]。

同样地,蔗糖转化酶(Invertase)在己糖信号途径中起着不可或缺的作用,参与蔗糖水解为己糖不可逆的过程。研究表明,由于蔗糖转化酶的缺失而造成植物发育的缺陷并不能够完全通过外源的己糖来弥补^[80]。一些木霉属,包括里氏木霉和构状木霉(*Trichoderma hamatum*)中缺少蔗糖转化酶而不能利用蔗糖^[81],而丝状真菌黑曲霉可产生两种糖基化形式的蔗糖水解酶和蔗糖转化酶。黑曲霉转化酶基因*suc1*可回补木霉属蔗糖缺陷型菌株^[82],因此,*suc1*基因可作为木霉属遗传转化的显性选择标记。

研究发现运用营养缺陷互补型或附加功能筛选标记进行转化子的筛选,必须产生一定的选择压力。例如培养基中不能含有与缺陷互补的氨基酸或核苷酸、培养基中用作筛选的糖必须是唯一的碳源等。这些条件在实验室都容易得到满足,但当需要通过分子水平应用于生产或自然环境的菌株进行改造时,很难对现有的营养缺陷互补型或附加功能筛选标记建立选择压力^[83]。

4 基因编辑在筛选标记中的应用

目前采用的基因敲除、插入及点突变修饰等基因组编辑技术中,多采用的是抗性筛选标记,存在一些弊端:被改造菌株可使用的抗生素数量有限;多基因改造会因抗性标记的叠加使用影响目的菌的正常生长;抗性基因本身是外源基因不是宿主菌生长所必需的,过多引入可能影响菌株生长。为此,筛选基因改造技术的产生为丝状真菌转化子筛选提供更多的可能。

4.1 无痕筛选

生酮古龙酸杆菌(*Ketogulonigenium vulgare*)中*upp*基因编码尿嘧啶磷酸核糖转移酶(Uracil phosphoribosyl transferase, UPRT),敲除该基因使细胞不能合成尿嘧啶,需要利用胞外尿嘧啶。5-氟尿嘧啶是胸腺嘧啶类似物,也能作为UPRT的底物被转化成胸苷酸合成酶的强烈抑制剂,即5-氟单磷

酸脱氧尿嘧啶, 它的存在会抑制胸腺嘧啶合成酶活性, 导致宿主细胞死亡^[84-85]。而 *upp* 基因缺失后菌体不能利用 5-氟尿嘧啶产生毒性, 可在含 5-氟尿嘧啶的培养基中生长, 即筛选到 *upp* 基因的突变株。因此, UPRT 借助 5-氟尿嘧啶的毒性可作为负向筛选标记使用。有实验证明了这一结论: 利用两次同源重组敲除了染色体上 UPRT 的全长基因 *upp*, 构建得到底盘细胞 *K. vulgare* Δupp 突变株, 经过 *upp* 基因回补实验, 验证了 UPRT 作为负向筛选标记使用的可行性^[86]。在此底盘细胞的基础上可以将 *upp* 基因作为负向筛选标记, 进行基因的无痕插入、敲除及修饰, 克服了使用抗生素筛选标记的缺陷, 实现无痕修饰, 该方法有利于获得具有高产优良性状的优势遗传菌株用于工业生产。

无痕改造技术克服了传统基因组编辑技术中“疤痕”的存在和筛选标记不能重复使用的不足, 实现多个基因的连续敲除而被广泛应用。

4.2 共转化标记筛选

共转化是指当受体细胞与不同的基因片段混合时, 细胞很大程度上会同时重组这些基因片段。因此, 当转化基因不易被直接检测时可把它同个易于检测的选择性标记进行共转化完成筛选。1987 年, Penttilä 等实验证明, 用无选择性标记的 DNA 与具选择性标记的质粒 DNA 进行共转化时, 共转化频率可高达 80%^[87]。1989 年, Goosen 等将大肠杆菌的 *lacZ* 基因和曲霉菌的 *trpC* 编码基因序列重组, 构成 *trpC-lacZ* 融合基因, 然后将其作为筛选标记插入到载体质粒上, 结果显示含有这种融合基因的曲霉菌转化子可在 X-gal 平板上呈现蓝色反应^[88], 而且已有研究显示这种颜色筛选系统同样适用于木霉菌属。

近年, 基于抗生素筛选标记的安全性问题, 人们发展了多种方法来删除抗生素筛选标记基因, 从而获得无选择标记基因的转基因物种^[89]。无选择标记基因方法有: 共转化法, Cre/lox、FLP/FRT、R/RS 的位点特异性重组系统, 利用转座子清除筛选标记, 染色体重组筛选标记等^[90], 已被广泛用于丝状真菌。

4.3 CRISPR/Cas9 系统在遗传筛选中的建立

CRISPR/Cas9 作为一种成熟的基因组编辑技术, 已广泛应用于不同物种的基因组编辑^[91]。在丝状真菌研究领域有关 CRISPR/Cas9 基因编辑体系的研究报道主要集中在里氏木霉、曲霉属、产黄青霉、玉米黑粉菌^[92]、链格孢^[93]等。2015 年, Liu 等将 CRISPR/Cas9 系统应用于里氏木霉, 利用 5-FOA 反筛获得 *ura5* 的突变体^[94]。进一步实验得到 Cas9 表达可控的 C30-cc 菌株^[95]。该菌株具有诱导性, 可通过改变培养条件诱导表达 Cas9 蛋白。为此在诱导条件下可以得到靶基因的突变株, 而在非诱导条件下不会产生靶基因的突变。Cas9 在诱导型启动子或其他条件激活的启动子下的表达使得 CRISPR/Cas9 系统成为丝状真菌基因组编辑的时空控制器^[94]。但是 CRISPR/Cas9 系统在敲除目标基因的过程中, Cas9 基因整合到基因组上使其结构的改变, 对后续实验结果可能产生一定影响。

研究发现自主复制元件在遗传转化过程起着重要作用。1988 年, Tsukuda 等在玉米黑粉菌找到酿酒酵母自主复制元件 ARS 的同源序列, 并检测到构巢曲霉复制起点 AMA1, 该基因具有高拷贝特性^[96-97]。2016 年, Pohl 等利用 CRISPR/Cas9 系统在产黄青霉 DS68530 ($\Delta hdfA$, ΔPen -cluster) 和 DS54468 ($\Delta hdfA$) 中实现了无筛选标记的基因组编辑^[98]。将 Cas9 蛋白与 sgRNA 装配成核糖体核蛋白复合体, 通过原生质体转化的方式导入产黄青霉 DS68530 中; Cas9 质粒中包含胞质复制元 AMA1 (曲霉属中的自主复制), 在无抗性压力的情况下很容易丢失, 因而在完成特定的基因编辑后, 很容易将 CRISPR/Cas9 系统剔除而实现无痕筛选; 最后通过 *amdS* 营养筛选可获得 *pks17* 基因(负责孢子绿色素的形成)突变株^[98]。2015 年, Nødvig 等在链格孢 (*Alternaria alternata*) 中构建了一种新型 CRISPR/Cas9 筛选系统, 可通用于亲缘关系相近的丝状真菌^[7]。该系统包含 Cas9 基因、sgRNA、AMA1 以及筛选标记。Cas9 基因的表达由来自构巢曲霉中组成型表达的 *tefl* 的强启动子和终止子控制^[99-100]。sgRNA

由构巢曲霉 *PgpdA* 启动子和 *TirpC* 终止子控制, 同时在 sgRNA 的两侧设计可以被核酶切割的 5'-end hammerhead 和 3'-end hepatitis delta virus 序列^[101-103]。因而可以通过 II 型 RNA 聚合酶转录, 并通过核酶切割获得 sgRNA^[101]。为在多种丝状真菌中都可以应用, 选择了 4 种不同的抗性筛选标记(AFUM_pyrG、AN_argB、ble^r 和 hyg^r), 并构建了 4 个不同的 CRISPR/Cas9 质粒^[97,104]。以棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)中 *yA* 为靶基因(突变株的分生孢子呈黄色, 而野生株是绿色)^[105-106], 通过表型很容易筛选 *yA* 突变株。因 AMA1 胞质复制元的存在, 最终在无抗性压力下丢失抗性筛选标记, 实现了无痕筛选。该技术的发展改善了过去经典的遗传筛选系统的缺陷, 为后续开发新的遗传筛选系统提供有力的工具。

5 总结和展望

丝状真菌与人们的生活密切相关, 广泛应用于工业、农业和医药生产等领域, 但这都离不开对丝状真菌的基础研究。然而在丝状真菌转化过程中, 要从大量非转化子的背景中筛选目标转化子必须依赖遗传筛选标记。可见, 筛选标记基因是遗传转化载体所必备元件。目前, 在丝状真菌遗传转化实验中常用筛选标记分为营养筛选标记和药物筛选标记两大类, 营养筛选标记相对于药物筛选标记比较经济实惠, 但营养缺陷型菌株的获取及高频回复突变率仍是一个难题; 药物筛选标记则更简单便捷, 但抗生素的高成本和安全性不可忽略: 基因横向转移使丝状真菌获得抗药性, 对人类及其生存环境产生潜在的危害; 遗传转化中使用的除草剂筛选标记基因也有可能改变生物的遗传多样性, 造成生态危害。

针对上述筛选标记的缺点, 当前发展的策略是利用基因组编辑技术改造筛选标记以获得更利于筛选目标转化子的技术。无痕改造技术克服了传统遗传筛选中“疤痕”的存在和筛选标记不能重复使用的不足, 实现多个基因的连续敲除而被广泛应用。

除此之外, 无选择标记基因的遗传转化系统直接获取无筛选标记基因受体或者是在转化时使用抗生素筛选标记基因, 然后再剔除该选择标记基因而被广泛应用。目前人们已经发展了多种方法来删除抗生素筛选标记基因获取无选择标记基因的转基因物种^[89]。利用共转化法可同时转入多个基因, 获得无筛选标记基因的转基因菌株。虽然无选择标记基因技术可避免使用抗药基因, 降低对生态环境造成的危害。但是在丝状真菌改造过程中存在一定局限性: 无痕筛选需要两次同源重组, 使得体内重组效率降低^[83]; 目前该技术在沙门氏菌(*Salmonella*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)有相关应用, 在丝状真菌中还是空白^[86]。新型基因组编辑技术的 CRISPR/Cas9 系统在丝状真菌遗传转化领域的应用改善了过去经典的遗传筛选系统的缺陷: 在质粒中同时加入 Cas9 蛋白、sgRNA、筛选标记和 AMA1, 使得 Cas9 蛋白和 sgRNA 共同作用于基因组编辑, 含 AMA1 的质粒在无抗性压力的情况下很容易丢失, 因而在完成特定的基因编辑后, 可以很容易将 CRISPR/Cas9 系统剔除而达到无痕筛选目的, 为丝状真菌新型遗传筛选系统的构建提供有力的手段。从营养筛选到 CRISPR/Cas9 技术, 遗传筛选在丝状真菌领域的基础研究越来越深入, 并取得显著成果。因此, 新的遗传筛选技术的开发和利用有待进一步探索。

REFERENCES

- [1] Cherry JR, Fidantsef AL. Directed evolution of industrial enzymes: an update[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14(4): 438-443
- [2] Idiris A, Tohda H, Kumagai H, et al. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(2): 403-417
- [3] Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(3): 297-306
- [4] Zhang XL, Zheng XM, Man Y, et al. Preparation of protoplast for efficient dna transformation of citric acid hyper-producing *Aspergillus niger* industrial strain[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(3): 171-177 (in Chinese)
张晓立, 郑小梅, 满云, 等. 黑曲霉柠檬酸工业菌株原生质体制备与转化[J]. 生物技术通报, 2015, 31(3): 171-177

- [5] Harman GE, Howell CR, Viterbo A, et al. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(1): 43-56
- [6] Chen XZ, Shen W, Fan Y, et al. Genomics and metabolic engineering of filamentous fungi in the postgenomics era[J]. *Hereditas*, 2011, 33(10): 1067-1078 (in Chinese)
陈献忠, 沈微, 樊游, 等. 后基因组时代的丝状真菌基因组学与代谢工程[J]. *遗传*, 2011, 33(10): 1067-1078
- [7] Nødvig CS, Nielsen JB, Kogle ME, et al. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133085
- [8] 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
- [9] Huang YL, Ye J, Jiang XL, et al. Advance in genetic transformation system of fungi[J]. *Microbiology China*, 2007, 34(6): 1213-1217 (in Chinese)
黄亚丽, 叶婧, 蒋细良, 等. 真菌遗传转化系统的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(6): 1213-1217
- [10] Ma SX, Cao KK, Liu N, et al. The *StLAC2* gene is required for cell wall integrity, DHN-melanin synthesis and the pathogenicity of *Setosphaeria turcica*[J]. *Fungal Biology*, 2017, 121(6/7): 589-601
- [11] Li YQ, Yuan XM, Wang M, et al. Function analysis of protein kinase A encoding genes in the growth, development and pathogenicity of *Botrytis cinerea*[J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2018, 41(2): 77-83 (in Chinese)
李玉琦, 袁雪梅, 王敏, 等. 灰葡萄孢 PKA 编码基因在病菌生长发育和致病过程中的功能[J]. *河北农业大学学报*, 2018, 41(2): 77-83
- [12] Zhang K, Yuan XM, Zang JP, et al. The kynurenine 3-monooxygenase encoding gene, *BcKMO*, is involved in the growth, development, and pathogenicity of *Botrytis cinerea*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1039
- [13] Xie XQ, Li ZY, Ma JF, et al. Cloning and sequence analysis of CITRE gene in *Cochliobolus lunatus*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011(7): 154-159 (in Chinese)
谢夏青, 李志勇, 马继芳, 等. 谷子弯孢菌海藻糖酶基因(CITRE)及其启动子的克隆和序列分析[J]. *生物技术通报*, 2011(7): 154-159
- [14] Li ZY, Zhu YB, Zhao HW, et al. Cloning and expression analysis of calcineurin gene from *Curvularia lunata*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2013, 28(5): 110-115 (in Chinese)
李志勇, 朱彦彬, 赵会薇, 等. 粟弯孢霉叶斑病菌钙调磷酸酶基因克隆及表达分析[J]. *华北农学报*, 2013, 28(5): 110-115
- [15] Geraskina NV, Butov IA, Yomantas YAV, et al. The *dtb* gene from *Bacillus amyloliquefaciens* encodes a putative d-tyrosyl-tRNA^{Tyr} deacylase and is a selectable marker for *Bacillus subtilis*[J]. *Microbiological Research*, 2015, 171: 90-96
- [16] Kelly JM, Hynes MJ. Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*[J]. *The EMBO Journal*, 1985, 4(2): 475-479
- [17] Gee R, Goyal A, Byerrum RU, et al. Two isoforms of dihydroxyacetone phosphate reductase from the chloroplasts of *Dunaliella tertiolecta*[J]. *Plant Physiology*, 1993, 103(1): 243-249
- [18] Dutka-Malen S, Mazodier P, Badet B. Molecular cloning and overexpression of the glucosamine synthetase gene from *Escherichia coli*[J]. *Biochimie*, 1988, 70(2): 287-290
- [19] Ram AFJ, Arentshorst M, Damveld RA, et al. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall[J]. *Microbiology*, 2004, 150(10): 3315-3326
- [20] Botstein D, Falco SC, Stewart SE, et al. Sterile host yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments[J]. *Gene*, 1979, 8(1): 17-24
- [21] Struhl K, Stinchcomb DT, Scherer S, et al. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(3): 1035-1039
- [22] Boeke JD, La Croute F, Fink GR. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance[J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1984, 197(2): 345-346
- [23] Jones EW, Fink GR. Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast[A]//Strathern JN, Jones EW, Broach JR. *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*[M]. New York: Cold Spring Harbor Press, 1982
- [24] Zhang XM, Guo CJ, Liu Y, et al. Cloning and expression of *trpBA* genes from *E. coli*[J]. *Letters in Biotechnology*, 2006, 17(1): 12-14 (in Chinese)
张绪梅, 郭长江, 刘云, 等. 大肠杆菌 *trpBA* 基因的克隆表达[J]. *生物技术通讯*, 2006, 17(1): 12-14
- [25] Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(6): 615-626
- [26] Lin WP, Liu XY, Wu JL, et al. Construction and expression of *trp* operon gene mutant of *E. coli*[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2010, 23(7): 711-713 (in Chinese)
林维平, 刘晓影, 武敬亮, 等. 大肠杆菌色氨酸操纵子基因突变株的构建与表达[J]. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(7): 711-713
- [27] Shen W, Wang ZX, Li YL, et al. Cloning and functional analysis of the *Candida glycerinogenes* *TRP1* gene[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(11): 1795-1800 (in Chinese)
沈微, 王正祥, 李艳丽, 等. 产甘油假丝酵母 *TRP1* 基因的克隆与功能分析[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(11): 1795-1800
- [28] Toyn JH, Gunyuzlu PL, White WH, et al. A counterselection for the tryptophan pathway in yeast: 5-fluoroanthranilic acid resistance[J]. *Yeast*, 2000, 16(6): 553-560
- [29] Kitada K, Yamaguchi E, Arisawa M. Cloning of the *Candida glabrata* *TRP1* and *HIS3* genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation[J]. *Gene*, 1995, 165(2): 203-206

- [30] Ugolini S, Tosato V, Bruschi CV. Selective fitness of four episomal shuttle-vectors carrying *HIS3*, *LEU2*, *TRP1*, and *URA3* selectable markers in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Plasmid, 2002, 47(2): 94-107
- [31] Kim SY, Marzluf GA. Transformation of *Neurospora crassa* with the *trp-1* gene and the effect of host strain upon the fate of the transforming DNA[J]. Current Genetics, 1988, 13(1): 65-70
- [32] Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984, 81(5): 1470-1474
- [33] Huang W, Wang TH, Wu ZH, et al. Advance in genetic transformation system of filamentous fungi[J]. Journal of Microbiology, 2000, 20(3): 40-44 (in Chinese)
黄卫, 汪天虹, 吴志红, 等. 丝状真菌遗传转化系统研究进展[J]. 微生物学杂志, 2000, 20(3): 40-44
- [34] Dave K, Ahuja M, Jayashri TN, et al. A novel selectable marker based on *Aspergillus niger* arginase expression[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 51(1): 53-58
- [35] Jin FJ, Maruyama JI, Juvvadi PR, et al. Development of a novel quadruple auxotrophic host transformation system by *argB* gene disruption using *adeA* gene and exploiting adenine auxotrophy in *Aspergillus oryzae*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 239(1): 79-85
- [36] Lenouvel F, van de Vondervoort PJ, Visser J. Disruption of the *Aspergillus niger argB* gene: a tool for transformation[J]. Current Genetics, 2002, 41(6): 425-432
- [37] Kalpaxis D, Werner H, Marcotte EB, et al. Positive selection for *Dictyostelium* mutants lacking uridine monophosphate synthase activity based on resistance to 5-fluoro-orotic acid[J]. Developmental Genetics, 1990, 11(5/6): 396-402
- [38] Kanamasa S, Yamaoka K, Kawaguchi T, et al. Transformation of *Aspergillus aculeatus* using the drug resistance gene of *Aspergillus oryzae* and the *pyrG* gene of *Aspergillus nidulans*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(12): 2661-2663
- [39] Long H, Wang TH, Zhang YK. Isolation of *Trichoderma reesei pyrG* negative mutant by UV mutagenesis and its application in transformation[J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2008, 24(5): 565-569
- [40] Hamed H, Misaghi A, Modarressi MH, et al. Generation of a uracil auxotroph strain of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* as a host for the recombinant protein production[J]. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 2013, 5(1): 29-34
- [41] Umezu K, Amaya T, Yoshimoto A, et al. Purification and properties of orotidine-5'-phosphate pyrophosphorylase and orotidine-5'-P-hosphate decarboxylase from bakers' yeast[J]. The Journal of Biochemistry, 1971, 70(2): 249-262
- [42] Ko N, Nishihama R, Pringle JR. Control of 5-FOA and 5-FU resistance by *Saccharomyces cerevisiae* YJL055W[J]. Yeast, 2008, 25(2): 155-160
- [43] Zhao SX, Lin JF, Wang J, et al. Advances in the development of biosafe selective markers for transgenic edible fungi[J]. Acta Edulis Fungi, 2007, 14(1): 55-61 (in Chinese)
赵姝娴, 林俊芳, 王杰, 等. 安全选择标记的转基因食用菌研究进展[J]. 食用菌学报, 2007, 14(1): 55-61
- [44] Li H, Wang BC, Xu WJ, et al. Identification and network of outer membrane proteins regulating streptomycin resistance in *Escherichia coli*[J]. Journal of Proteome Research, 2008, 7(9): 4040-4049
- [45] Gritz L, Davies J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Gene, 1983, 25(2/3): 179-188
- [46] Wang J, Holden DW, Leong SA. Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, 85(3): 865-869
- [47] Punt PJ, Dingemans MA, Jacobs-Meijsing BJM, et al. Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*[J]. Gene, 1988, 69(1): 49-57
- [48] Dong XY, Zhang K, Gao YQ, et al. Expression of hygromycin B resistance in oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. (higher Basidiomycetes) using three gene expression systems[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2012, 14(1): 21-26
- [49] Wang M, Dong LP, Zhao B, et al. Analysis of mutant gene in BCt98 mutant enhanced pathogenicity of *Botrytis cinerea*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2015, 30(3): 37-41 (in Chinese)
王敏, 董丽萍, 赵斌, 等. 灰葡萄孢致病力增强突变体 BCt98 的突变基因分析[J]. 华北农学报, 2015, 30(3): 37-41
- [50] Wang X, Xing JH, Zhao B, et al. Cloning and functional analysis of a gene related to conidiospore formation in *Botrytis cinerea*[J]. Microbiology China, 2013, 40(3): 533-543 (in Chinese)
王璇, 邢继红, 赵斌, 等. 灰葡萄孢分生孢子产生相关基因的克隆及功能分析[J]. 微生物学通报, 2013, 40(3): 533-543
- [51] Blochlinger K, Diggelmann H. Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells[J]. Molecular and Cellular Biology, 1984, 4(12): 2929-2931
- [52] Ning LY, Bao MZ, Zhang W. Effect of geneticin on leaf callus induction and rooting in *Petunia hybrida*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, 30(4): 670-675 (in Chinese)
宁露云, 包满珠, 张蔚. 遗传霉素对矮牵牛叶片愈伤组织诱导及生根的影响[J]. 核农学报, 2016, 30(4): 670-675
- [53] Cao Y, Liu YX, Tan YM, et al. Construction of G418 resistance gene expression cassette in binary vector and genetic transformation of *Aspergillus chevalieri* var. *intermedius*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(6): 2509-2513 (in Chinese)
曹昉, 刘永翔, 谭玉梅, 等. G418 抗性基因 *nptII* 双元载体的构建及谢瓦氏曲霉间型变种的遗传转化[J]. 西南农业学报, 2013, 26(6): 2509-2513
- [54] Smith RM, Peterson WH, McCoy E. Oligomycin, a new antifungal antibiotic[J]. Antibiotics & Chemotherapy (Northfield), 1954, 4(9): 962-970

- [55] Lardy HA, Johnson D, McMurray WC. Antibiotics as tools for metabolic studies. I. A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1958, 78(2): 587-597
- [56] Racker E. A mitochondrial factor conferring oligomycin sensitivity on soluble mitochondrial ATPase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1963, 10(6): 435-439
- [57] Racker E. A reconstituted system of oxidative phosphorylation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1963, 14(1): 75-78
- [58] Kagawa Y, Racker E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. 8. Properties of a factor conferring oligomycin sensitivity on mitochondrial adenosine triphosphatase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1966, 241(10): 2461-2466
- [59] Ward M, Wilkinson B, Turner G. Transformation of *Aspergillus nidulans* with a cloned, oligomycin-resistant ATP synthase subunit 9 gene[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1986, 202(2): 265-270
- [60] Ward M, Wilson LJ, Carmona CL, et al. The *oliC3* gene of *Aspergillus niger*: isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation[J]. Current Genetics, 1988, 14(1): 37-42
- [61] Cane DE. Introduction: polyketide and nonribosomal polypeptide biosynthesis. From collie to *coli*[J]. Chemical Reviews, 1997, 97(7): 2463-2464
- [62] Galm U, Wang LY, Wendt-Pienkowski E, et al. *In vivo* manipulation of the bleomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces verticillus* ATCC15003 revealing new insights into its biosynthetic pathway[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(42): 28236-28245
- [63] Kawano Y, Kumagai T, Muta K, et al. The 1.5 Å crystal structure of a bleomycin resistance determinant from bleomycin-producing *Streptomyces verticillus*[J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 295(4): 915-925
- [64] Kumagai T, Hibino R, Kawano Y, et al. Mutation of the N-terminal proline 9 of BLMA from *Streptomyces verticillus* abolishes the binding affinity for bleomycin[J]. FEBS Letters, 1999, 450(3): 227-230
- [65] Masanori S, Thompson CJ, Takanori K, et al. Characterisation by molecular cloning of two genes from *Streptomyces verticillus* encoding resistance to bleomycin[J]. Gene, 1994, 151(1/2): 11-16
- [66] Avenot HF, Michailides TJ. Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California[J]. Plant Disease, 2007, 91(10): 1345-1350
- [67] Avenot HF, Sellam A, Karaoglanidis G, et al. Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with Boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio[J]. Phytopathology, 2008, 98(6): 736-742
- [68] Bardin SD, Huang HC. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2001, 23(1): 88-98
- [69] Beever RE, Brien HMR. A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*[J]. New Zealand Journal of Agricultural Research, 1983, 26(3): 391-400
- [70] Colanduoni JA, Villafranca JJ. Inhibition of *Escherichia coli* glutamine synthetase by phosphinothricin[J]. Bioorganic Chemistry, 1986, 14(2): 163-169
- [71] Gill HS, Eisenberg D. The crystal structure of phosphinothricin in the active site of glutamine synthetase illuminates the mechanism of enzymatic inhibition[J]. Biochemistry, 2001, 40(7): 1903-1912
- [72] Avalos J, Geever RF, Case ME. Bialaphos resistance as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa*[J]. Current Genetics, 1989, 16(5/6): 369-372
- [73] Li PF, Zhao FX, Dong LP, et al. Function analysis of *BcKMO* gene in growth, development and pathogenicity of *Botrytis cinerea*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(15): 2971-2979 (in Chinese)
李培芬, 赵福鑫, 董丽萍, 等. 灰葡萄孢 *BcKMO* 在病菌生长、发育和致病过程中的功能[J]. 中国农业科学, 2014, 47(15): 2971-2979
- [74] Li TQ, Gao YN, Gao JR, et al. Different methods for detection of *bar* gene in transgenic wheat[J]. Journal of Triticeae Crops, 2015, 35(9): 1190-1193 (in Chinese)
李太强, 高亚男, 高居荣, 等. 转基因小麦中 *bar* 基因检测方法研究[J]. 麦类作物学报, 2015, 35(9): 1190-1193
- [75] Wang GZ, Li YN, Zhang ZF, et al. Advances of herbicide resistance genes[J]. Current Biotechnology, 2011, 1(6): 398-402 (in Chinese)
王国增, 李轶女, 张志芳, 等. 除草剂抗性基因的研究进展[J]. 生物技术进展, 2011, 1(6): 398-402
- [76] Wang TH, Wu ZH, Liu SL, et al. Construction of heterogeneous genes expression system of filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 19(6): 736-742 (in Chinese)
汪天虹, 吴志红, 刘世利, 等. 丝状真菌瑞氏木霉外源基因表达系统的构建[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(6): 736-742
- [77] Li HJ, Lu JP, Liu XH, et al. Vectors building and usage for gene knockout, protein expression and fluorescent fusion protein in the rice blast fungus[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2012, 20(1): 94-104 (in Chinese)
李海娇, 卢建平, 刘小红, 等. 适用于稻瘟病菌基因敲除、过表达和荧光融合蛋白表达载体的构建和使用[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(1): 94-104
- [78] Tang J, Ma Y, Wang SM, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Trichoderma atroviride* with G418 as screening marker[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2014, 42(12): 185-189 (in Chinese)
唐俊, 马越, 王姝妹, 等. 以 G418 抗性为筛选标记的深绿木霉遗传转化研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2014, 42(12): 185-189
- [79] Duan YB, Zhai CG, Li H, et al. An efficient and high-throughput protocol for agrobacterium-mediated transformation based on phosphomannose isomerase positive selection in *Japonica rice* (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(9): 1611-1624

- [80] Jang JC, León P, Zhou L, et al. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants[J]. *The Plant Cell*, 1997, 9(1): 5-19
- [81] Danielson RM, Davey CB. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1973, 5(5): 485-494
- [82] Fincham JRS. Transformation in fungi[J]. *Microbiological Reviews*, 1989, 53(1): 148-170
- [83] Le YL, Sun Y, Wang HC, et al. Advances in selection markers and their bio-safety in applications of transformed microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(8): 1814-1821 (in Chinese)
乐易林, 孙宇, 王洪成, 等. 微生物遗传转化筛选标记及其生物安全性的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(8): 1814-1821
- [84] Hasegawa N, Abei M, Yokoyama KK, et al. Cyclophosphamide enhances antitumor efficacy of oncolytic adenovirus expressing uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) in immunocompetent Syrian hamsters[J]. *International Journal of Cancer*, 2013, 133(6): 1479-1488
- [85] Andersen PS, Smith JM, Mygind B. Characterization of the *upp* gene encoding uracil phosphoribosyltransferase of *Escherichia coli* K12[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1992, 204(1): 51-56
- [86] Lu H, Li TM, Liu JL, et al. Construction of a marker-free deletion system based on the uracil phosphoribosyl transferase gene as a negative selection marker in *Ketogulonigenium vulgare*[J]. *Food Science*, 2017, 38(4): 39-44 (in Chinese)
陆浩, 李天明, 刘金雷, 等. 基于尿嘧啶磷酸核糖转移酶为负向筛选标记的生酮古龙酸杆菌基因组无痕修饰系统的构建[J]. *食品科学*, 2017, 38(4): 39-44
- [87] Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, et al. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. *Gene*, 1987, 61(2): 155-164
- [88] Goosen T, van Engelenburg F, Debets F, et al. Tryptophan auxotrophic mutants in *Aspergillus niger*: inactivation of the *trpC* gene by cotransformation mutagenesis[J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1989, 219(1/2): 282-288
- [89] Gao XQ, Zhou J, Li J. Efficient generation of marker-free transgenic rice plants using an improved transposon-mediated transgene reintegration strategy[J]. *Plant Physiology*, 2015, 167(1): 11-24
- [90] Chen YX, Zhang ZG, Lu TG. Review of marker-free transgenic crop[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012(12): 1-7 (in Chinese)
陈扬勋, 张治国, 路铁刚. 无筛选标记转基因作物的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2012(12): 1-7
- [91] Wang YH, Zou WN, Kang YL, et al. Progress and prospect of CRISPR/Cas system research and development[J]. *Current Biotechnology*, 2017, 7(6): 594-600 (in Chinese)
王友华, 邹婉依, 康宇立, 等. CRISPR/Cas 系统研发进展及展望[J]. *生物技术进展*, 2017, 7(6): 594-600
- [92] Schuster M, Schweizer G, Reissmann S, et al. Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2016, 89: 3-9
- [93] Wenderoth M, Pinecker C, Voß B, et al. Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2017, 101: 55-60
- [94] Liu R, Chen L, Jiang YP, et al. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Cell Discovery*, 2015, 1: 15007
- [95] Seiboth B, Karimi RA, Phatale PA, et al. The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 84(6): 1150-1164
- [96] Tsukuda T, Carleton S, Fotheringham S, et al. Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1988, 8(9): 3703-3709
- [97] Gems D, Johnstone IL, Clutterbuck AJ. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency[J]. *Gene*, 1991, 98(1): 61-67
- [98] Pohl C, Kiel JAKW, Driessen AJM, et al. CRISPR/Cas9 based genome editing of *Penicillium chrysogenum*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(7): 754-764
- [99] Kitamoto N, Matsui J, Kawai Y, et al. Utilization of the TEF1-a gene (*TEF1*) promoter for expression of polygalacturonase genes, *pgaA* and *pgaB*, in *Aspergillus oryzae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50(1): 85-92
- [100] Tamano K, Bruno KS, Karagiosis SA, et al. Increased production of fatty acids and triglycerides in *Aspergillus oryzae* by enhancing expressions of fatty acid synthesis-related genes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(1): 269-281
- [101] Gao YB, Zhao YD. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR-mediated genome editing[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 56(4): 343-349
- [102] Jacobs JZ, Ciccaglione KM, Tournier V, et al. Implementation of the CRISPR-Cas9 system in fission yeast[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5344
- [103] Nissim L, Perli SD, Fridkin A, et al. Multiplexed and programmable regulation of gene networks with an integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit in human cells[J]. *Molecular Cell*, 2014, 54(4): 698-710
- [104] Ruiz-Díez B. Strategies for the transformation of filamentous fungi[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(2): 189-195
- [105] O'Hara EB, Timberlake WE. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *yA* locus[J]. *Genetics*, 1989, 121(2): 249-254
- [106] Nielsen ML, Albertsen L, Lettier G, et al. Efficient PCR-based gene targeting with a recyclable marker for *Aspergillus nidulans*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2006, 43(1): 54-64