

高效大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 基因敲除体系的构建

田李, 陈捷胤, 汪佳妮, 王金龙, 戴小枫*

中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

摘要: 【目的】为了深入研究大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 致病基因的功能, 构建高效大丽轮枝菌基因敲除体系。【方法】融合 PCR 构建基因敲除载体; 利用农杆菌介导法转化大丽轮枝菌; 使用在 T-DNA 之间加入致死基因的双元载体, 使 T-DNA 随机插入转化子在添加 5-氟脱氧尿苷的培养基上不能存活, 实现对随机插入转化子的“反向筛选”。【结果】对大丽轮枝菌腺嘌呤合成酶基因和几丁质合成酶基因进行基因敲除验证, 基因敲除转化子在总转化子中的比例分别达到 87% 和 44%。【结论】成功构建大丽轮枝菌高效基因敲除体系, 为大丽轮枝菌致病基因的功能验证提供了技术平台。

关键词: 大丽轮枝菌, 基因敲除, 融合 PCR, 农杆菌介导转化, 致死基因, 5-氟脱氧尿苷

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 07-0906-08

大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 是引起棉花黄萎病 (*Verticillium wilt*) 的病原菌, 目前几乎遍及全球各主要棉区, 造成严重经济损失^[1]。但是近年来关于其致病相关基因的研究相对比较缓慢, 一个重要的原因是缺乏大丽轮枝菌基因功能分析的手段。基因敲除是研究基因功能最具说服力的遗传操作方法之一, 它是指对一个 DNA 序列已知但功能未知的基因, 以同源重组技术为基础, 通过构建带有同源重组 DNA 片段的基因敲除载体, 将其转化入细胞, 取代基因组中野生型的等位基因, 通过分析突变体表型而明确基因功能的方法^[2]。

大丽轮枝菌基因敲除依赖于其转化体系的成功构建。近年来, 农杆菌介导的遗传转化在大丽轮枝菌中的成功应用, 极大地提高了转化效率, 为大丽轮枝菌的基因敲除奠定了基础^[3]。大丽轮枝菌基因敲除主要包括载体构建、农杆菌介导转化、转化子筛选和分子鉴定 4 个步骤, 其中转化子筛选是一个技

术难点。因为将同源重组 DNA 片段克隆到双元载体的 T-DNA 后, 借助农杆菌介导的转化虽然极大地提高了同源重组片段的转化效率, 但是由于 T-DNA 自身的性质, 它会随机整合到基因组中, 造成 T-DNA 随机插入转化子和同源双交换产生的基因敲除转化子都带有同样的选择标记而难于区分。而且等位基因同源重组的效率相对 T-DNA 随机插入的效率低很多, 造成基因敲除转化子数量远远少于随机插入的转化子, 往往需要筛选大量转化子才能得到基因敲除的转化子。

为解决上述问题, 研究人员将“反向筛选”技术引入到真菌基因敲除体系。其基本理论是在 T-DNA 之间除了加入同源重组 DNA 片段, 还加入了致死基因单纯疱疹病毒胸苷激酶 (herpes simplex virus thymidine kinase, *HSVtk*), 可将添加在培养基中的特定化合物 5-氟脱氧尿苷 (5-fluoro-2'-deoxyuridine, F2dU) 转变为真菌的毒性物质, 从而使

基金项目: 科技基础性工作专项 (SB2007FY027); 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2008ZX08005-002)

* 通信作者。Tel: +86-10-62815976; Fax: +86-10-62895382; E-mail: dxf@caas.net.cn

作者简介: 田李 (1984-) 男, 山东曲阜人, 博士研究生, 主要从事真菌致病机理研究。E-mail: tianlicaas@gmail.com

收稿日期: 2011-01-18; 修回日期: 2011-03-07

T-DNA 随机插入转化子不能存活, 反过来即提高基因敲除转化子的比例^[4]。该技术在稻瘟病菌和尖孢镰刀菌中已经试验成功。本文以敲除腺嘌呤合成酶 (amido-phosphoribosyl transferase, *ADE4*) 基因和几丁质合成酶 (chitin synthase V, *ChsV*) 基因为例, 将该技术的参数优化后引入到大丽轮枝菌, 同时分别优化了载体构建和转化子分子鉴定这两个步骤,

构建了大丽轮枝菌高效的基因敲除体系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本文所用菌株和质粒见表 1。

表 1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
Vd991	<i>Verticillium dahliae</i> strain	This lab
AGL-1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Guangxi University
Top10	<i>Escherichia coli</i> competent cell	TransGen Biotech Company
Plasmids		
pUC-Hyg	Plasmid carrying Hyg resistant cassette	Guangxi University
pGKO2-Gateway	Gene knockout plasmid	Pennsylvania State University ^[4]
pBHt2- <i>tk</i>	Plasmid containing <i>HSVtk</i> in T-DNA	Pennsylvania State University

1.1.2 培养基: LB 用于大肠杆菌培养, YEB 用于农杆菌液体培养, CM 和 PDA 培养基用于大丽轮枝菌的培养, 配制方法参照文献 [5]。MM 和 IM^[6] 用于转化农杆菌的培养。

1.1.3 主要试剂和仪器: 乙酰丁香酮, 5-氟脱氧尿苷和腺嘌呤购自美国 Sigma 公司。潮霉素 B 购自德国 Merck 公司, 其他抗生素均购自北京化学试剂公司。PCR 仪购自德国 Biometra 公司。凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 基因敲除质粒 pKO-*ADE4* 和 pKO-*ChsV* 的构建

ADE4 基因的同源重组 DNA 片段构建分 3 轮 PCR 进行 (图 1, A-C)。第 1 轮 PCR (常规 PCR): 以质粒 pUC-Hyg 为模板, 以 Hyg-F/R 为引物 (本研究引物名称和序列见表 2), 扩增长度为 1.8 kb 的潮霉素抗性基因盒。反应条件为: 30 × (94°C 30 s, 58°C 1 min, 72°C 2 min)。以大丽轮枝菌基因组为模板, 分别以 5F/5R 和 3F/3R 为引物, 引物 5R/3F 5'端的 20 bp 含有与 Hyg-F/R 互为反向互补的接头, PCR 扩增长度均为 1 kb 的 *ADE4* 基因 (VDAG_00128, Broad Institute) 上下游 DNA 片段, 获得末端含有相应互为反向互补序列的 3 个 PCR 产物。反应条件为: 30 × (94°C 30 s, 58°C 1 min, 72°C 1 min)。第 2 轮 PCR (融合 PCR): 不加入任何引物, 以第 1 轮 PCR 得到的反应产物为模板, 利用 DNA 片段末端的反向互补序列 (接头) 自身退火并结合, 使潮霉素抗

性基因盒两侧各与 *ADE4* 基因上下游 DNA 片段首尾相接。反应条件为: 12 × (94°C 30 s, 58°C 2 min, 72°C 4 min)。第 3 轮 PCR (巢式 PCR): 以第 2 轮 PCR 产物为模板, 以带有 Gateway BP 反应接头的 Nest-F/R 为巢式引物, 特异性扩增上述融合 DNA 片段。反应条件为: 30 × (94°C 30 s, 58°C 2 min, 72°C 4 min)。最后, 通过 Gateway BP 反应将此片段克隆到 pGKO2-Gateway 载体的 T-DNA 区段 (该载体在 T-DNA 之间加有致死基因 *HSVtk*, 图 1), 构建成基因敲除载体 pKO-*ADE4*。同样的方法构建 *ChsV* 基因 (VDAG_00420, Broad Institute) 敲除质粒 pKO-*ChsV*。

1.3 农杆菌介导的大丽轮枝菌转化

冻融法将基因敲除质粒 pKO2-*ADE4*, pKO2-*ChsV* 转化到农杆菌 AGL-1 中, 用于大丽轮枝菌的遗传转化。转化方法参照 Mullins 等^[7] 的方法进行。

1.4 转化子的筛选

为测试“反向筛选”体系是否适用于大丽轮枝菌, 将测试质粒 pBHt2-*tk* 通过农杆菌介导转入大丽轮枝菌。质粒 pBHt2-*tk* 在 T-DNA 区段同时含有潮霉素抗性基因和 *HSVtk* (图 2)。通过潮霉素 (30 μg/mL) 抗性筛选得到 T-DNA 随机插入的转化子, 命名为 Δ*tk*, 将其培养在 F2dU 浓度梯度分别为 0.005、0.05、0.5、5 和 50 μmol/L 的 PDA 培养基中, 5 d 后观察菌落表型。

表 2 本研究所使用的引物
Table 2 Primers used in the present study

Primer name	Sequences (5'→3')
Primers for gene disruption of <i>ADE4</i>	
5F	GTAATGTAGCGAATGCCTGTG
5R	<u>GCCCAAAAATGCTCCTTCAA</u> GTTGACGCTCATCGACAGA
3F	CCCTGGGTTTCGCAAAGATAA <u>TAGGTTTCCGACTCCGATGC</u>
3R	TAGGCTGCACAAGATTGGTG
Nest-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGCATGGGTACATGGCACT
Nest-R	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTGCTTTCAGCAAAGGACATG
Hyg-F	TTGAAGGAGCATTTTTGGGC
Hyg-R	TTATCTTTCGGAACCCAGGG
Test-1	CACTGACAGCCTTCTCTGCCAC
Test-2	CATCCACTTCAACGCTCGCAT
Test-3	CTGCCTTCAGACTCAACATCTTCG
Test-4	AGGTCGGGCGTGTAGGACTTCA
GAPDHF	CAAGGACTGGAGAGGTGG
GAPDHR	TTCACTCGTTGTCGTACC
Primers for gene disruption of <i>ChsV</i>	
5F	CAGGTCTTGCCCTTTATTG
5R	<u>GCCCAAAAATGCTCCTTCAA</u> CAGGACGCTGATTTGGTAT
3F	CCCTGGGTTTCGCAAAGATAA <u>TACCTTTCCTACAAGACGA</u>
3R	CCTAACGCATTTACTGTCAAAC
Nest-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGCGACTCTACTAGAAGCTGC
Nest-R	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTGAGTTTGTGCTTGGGTC
Test-1	TTGCTTCCGTAACGGCGTCT
Test-2	TTCGGGTCCAGCATGACACT
Test-3	CCTGACCACAACCAAAACGG
Test-4	CTTGAAAACCTGGAAGCCCT
Primers for real-time PCR	
ChsVI-1	CTGGAAGATGTTTTCGGAAGACG
ChsVI-2	GGTGATGACCAATCGACGAG
β -tubulin-1	GGCCGCCTCTGACTTCCGTAAC
β -tubulin-2	CTCGACCTCCTTCATGGCAACCTT

The underlined regions are the attached tail sequence complementary to the primer HygF and HygR, respectively. Waved lines refer to *attB1* and *attB2* for Gateway BP reaction.

1.5 *ADE4* 和 *ChsV* 基因敲除的分子生物学验证

在添加有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢霉素, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素和适量浓度的 F2dU 的培养基上进行转化子抗性筛选, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d 即可出现转化子。对其进行单孢分离, 即获得候选基因敲除的突变体。PCR 和 RT-PCR 方法对候选转化子进行分子生物学验证。

1.6 *ADE4* 和 *ChsV* 基因敲除的表型验证

1.6.1 *ADE4* 基因敲除的表型验证: 将候选 *ADE4* 基因敲除的突变体, 分别一一对应接种在基本培养基 (MM) 和添加有腺嘌呤的基本培养基 (MM + ade) 上。5 d 后观察菌落生长情况。

1.6.2 *ChsV* 基因敲除的表型验证: 参照 Elson-Morgan 方法^[8] 进行几丁质含量测定, 实验重复 3 次。以组成型表达的 β -tubulin 为参照基因, 按照

$2^{-\text{Ct}}$ 法计算 *ChsVI* 基因在 $\Delta ChsV$ 与野生型菌株之间的相对表达水平^[9], 重复 3 次。

2 结果

2.1 融合 PCR 成功构建基因突变载体

第 1 轮 PCR 扩增得到了预期长度分别为 1、1.8 和 1 kb 的 *ADE4* 基因左臂, 潮霉素抗性基因盒和 *ADE4* 基因右臂 DNA 片段 (图 1-D 前 3 泳道)。第 2 轮 PCR 通过上述 3 个 DNA 片段末端反向互补序列的相互退火结合, 构建成潮霉素抗性盒两端分别连接有 *ADE4* 基因上下游片段的 DNA 融合体。但是此时该融合体的量比较低, 并且夹杂有大量的 2 个 DNA 片段的融合体和尚未融合的片段, 电泳呈现

smear 状 (图 1-D 第 4 泳道)。经过第 3 轮巢式 PCR 特异性地扩增, 成功得到了预期的 3.8 (1 + 1.8 + 1) kb *ADE4* 同源重组片段 (图 1, D 第 5 泳道)。通过 Gateway BP 反应将 *ADE4* 同源重组片段克隆在 pGKO2-Gateway 上得到 pKO-*ADE4*。同样的方法构建了 pKO-*ChsV*。

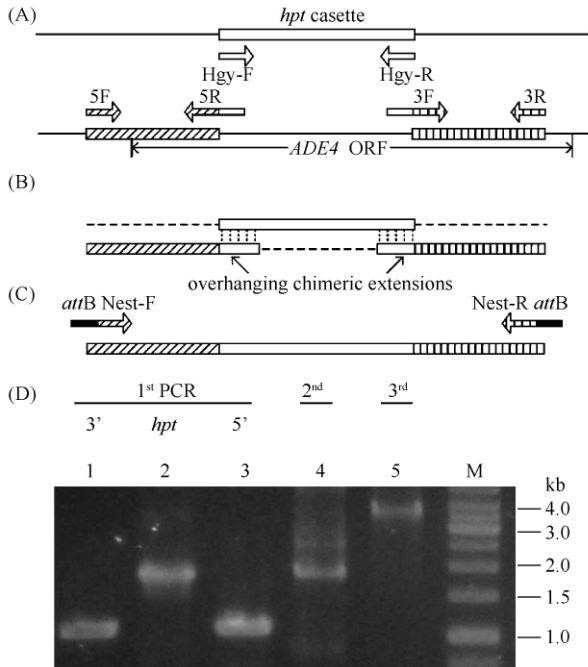


图 1 基因敲除质粒 pKO-*ADE4* 构建的流程

Fig. 1 Schematic representation (A-C) and electrophoresis pattern (D) of the construction of gene replacement cassette Mutant-allele-*ADE4*. (A) First round PCR: amplification of the components using the specific and chimeric primers. The chimeric primers (5R/3F) contain the white box at the beginning of each primer indicating the attached tail sequence complementary to the primer Hyg-F and Hyg-R respectively. (B) Second round PCR: the overhanging chimeric extensions fusion with each other. (C) Third round PCR: amplification of the final product Mutant-allele-*ADE4* using nested primers with attB site at 5' end of each primer to generate PCR products suitable for use as substrates in following Gateway BP recombination (D) The photograph of the agarose gel electrophoresis of the resulting products of each PCR step in constructing a deletion cassette of *ADE4*.

2.2 添加 50 $\mu\text{mol/L}$ F2dU 有助于转化子的“反向筛选”

将野生型菌株与 Δtk 分别培养在添加有不同浓度 F2dU 的 PDA 培养基中, 其菌落表型如图 2 所示。结果显示, 野生型菌株的生长不受 F2dU 的抑制; 携带有 *HSVtk* 基因的 T-DNA 随机插入转化子 Δtk 在添

加有 5 $\mu\text{mol/L}$ F2dU 的 PDA 培养基中, 生长受到明显抑制, 当 F2dU 浓度提高到 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 转化子完全不能生长。因此, 使用 50 $\mu\text{mol/L}$ F2dU 可以抑制携带有 *HSVtk* 基因的 T-DNA 随机插入转化子的生长, 表明“反向筛选”体系适用于大丽轮枝菌。所以在基因敲除实验中, 应用在 T-DNA 中同样带有 *HSVtk* 基因的载体 pGKO2-Gateway 同时在抗性筛选培养基中添加 50 $\mu\text{mol/L}$ F2dU, 用来抑制随机插入突变体的产生。

2.3 分子生物学证据支持 *ADE4* 和 *ChsV* 基因敲除突变体的成功构建

随机挑选 15 个候选 *ADE4* 基因敲除的转化子, 对其进行了分子生物学验证。如图 3-B 所示, 以野生型菌株基因组作为模板, 以 test-1/2 作为引物, 扩增出了预期 1.2 kb 的 DNA 片段; 同样条件下以 15 个候选突变体 DNA 作为模板, 其中 13 个 (1、2、3、4、5、7、8、9、10、12、13、14、15 和 16 号) 候选突变体扩增出了单一的 1.8 kb DNA 片段。说明 13 个转化子中 *ADE4* 基因 1.2 kb 编码框成功地被 1.8 kb 潮霉素抗性基因盒同源双交换所替代掉, 使引物 test-1/2 在基因组中的距离增大到 1.8 kb。其余 2 个转化子 (6 和 11 号) 显示 1.2 kb (野生型 *ADE4* 基因 ORF 的扩增条带) 和 1.8 kb (随机插入 T-DNA 中同源重组片段的扩增条带) 的双电泳条带, 因此它们为 T-DNA 随机插入的转化子。*ADE4* 基因敲除转化子在总转化子中比例为 13/15 = 87%。以野生型菌株 cDNA 作为模板, 以 test-3/4 (设计在突变体中被替换掉的区域) 为引物, RT-PCR 扩增出了预期 0.5 kb 条带, 以上述 13 个突变体 cDNA 作为模板, 相同条件下 RT-PCR 均没有任何扩增产物产生 (图 3, B 中以 1 号和 2 号为例展示), 说明突变体菌株丧失了 *ADE4* 基因的转录, 进一步证明 $\Delta ADE4$ 突变体的成功构建。随机挑选 16 个候选的 *ChsV* 基因敲除突变体, 按照同样的方法进行分子生物学检测, 7 个 (3、4、6、8、9、13 和 16 号) 突变体扩增出了单一的 1.8 kb DNA 片段, 基因敲除转化子在总转化子中比例为 7/16 = 44%。RT-PCR 同样显示 7 个突变体 *ChsV* 转录的丧失 (图 3, C 中以 3 号和 4 号为例展示)。

2.4 生物学表型验证支持 *ADE4* 和 *ChsV* 基因敲除突变体的成功构建

ADE4 是一个基础代谢基因, 负责腺嘌呤生物合成。*ChsV* 是几丁质合成酶基因家族中的一员, 在

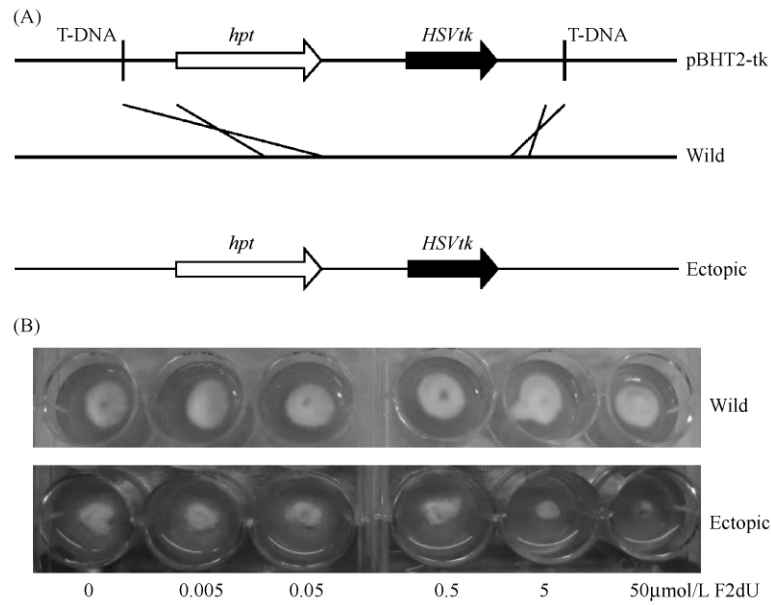


图2 F2dU对T-DNA中带有HSVtk基因的大丽轮枝菌转化子的致死效应

Fig. 2 Lethal effect of F2dU against ectopic transformant bearing HSVtk. (A) Schematic diagram of generation of Δtk bearing HSVtk by transformation of pBHt2-tk (B) Growth of *V. dahliae* wild-type strains and Δtk in the presence of F2dU at concentrations ranging from 0.005 to 50 $\mu\text{mol/L}$.

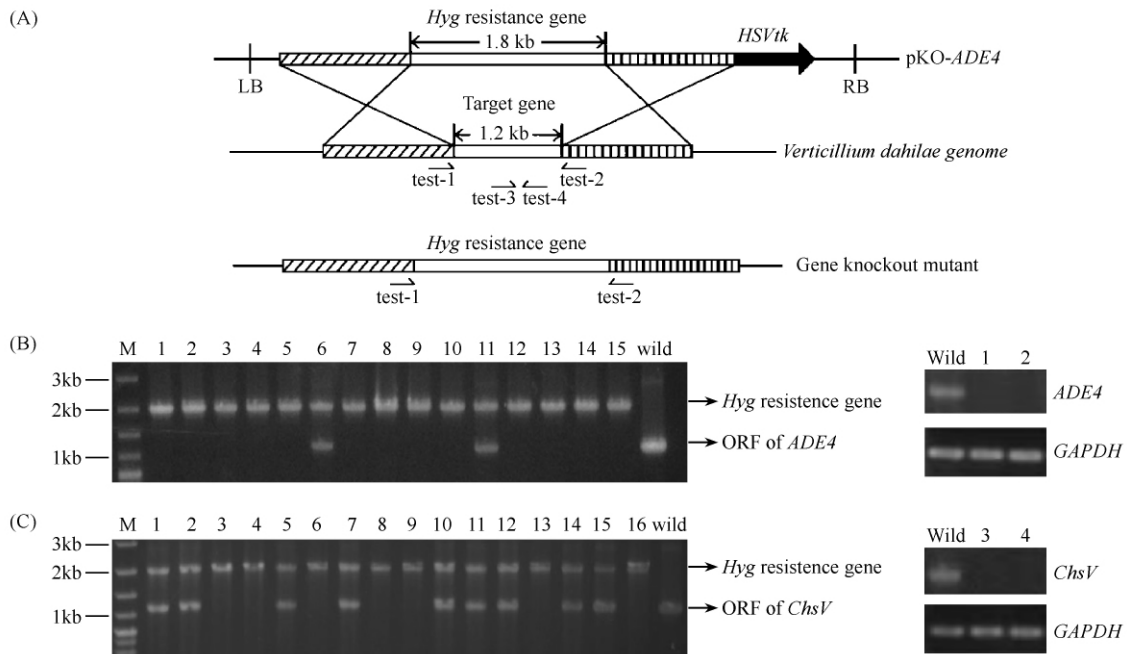


图3 大丽轮枝菌ADE4和ChsV基因敲除示意图及转化子的分子生物学验证

Fig. 3 Gene targeting replacement for the ADE4 and ChsV gene in *Verticillium dahliae*. (A) Partial map of the target gene fragment on the wild type chromosome and the targeting vector. The 1.2 kb ORF of target gene was replaced by the 1.8 kb hyg resistance cassette through homologous recombination between the genomic DNA and the deletion plasmid. (B) Characterization of the ADE4 deletion mutant with PCR primers Test-1 and Test-2. Line 1-15 represent electrophoresis band of 15 putative ADE4 mutant strains and Line 16 represents wild-type *V. dahliae*. The ADE4 gene transcript was detected by RT-PCR using the primer pair Test-3 and Test-4. The glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) transcript was used as an internal control. (C) Characterization of the ChsV deletion mutant using the methods mentioned above.

不同的真菌中,该基因的作用和表达调控各有不同,其在大丽轮枝菌中的功能尚不十分明确。

2.4.1 *ADE4* 突变体表型验证:如图4所示,野生型菌株(左上角白色方框)在基本培养基(MM)和添加有腺嘌呤的基本培养基(MM + ade)上都能生长。上文随机挑选的15个转化子中,13个转化子(1、2、

3、4、5、7、8、9、10、12、13、14、15和16号)表型发生了变化,表现为在MM + ade上可以生长,在MM上不能生长,说明*ADE4*的生物学功能被基因敲除破坏。转化子(6和11号)表型与野生型相比没有发生变化。因此,生物学表型也支持13个*ADE4*基因敲除突变体的成功构建。

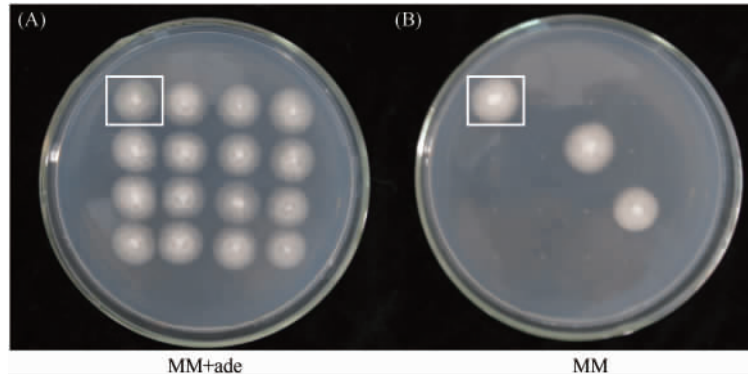


图4 经*ADE4*基因敲除后腺嘌呤营养缺陷型的获得

Fig.4 Adenine auxotrophic mutants obtained by targeted replacement of *ADE4*. The same transformants growing on minimal medium (B) and minimal medium supplemented with 1 mM adenine (A). Wild-type is located at top left corners (white square).

2.4.2 几丁质合成酶 *ChsV* 缺失突变体的表型验证:实验证明上文得到的7个*ChsV*缺失突变体均具有相同的表型。下文以3号突变体为例进行阐述。Elson-Morgan实验表明3号突变体菌株几丁质含量相对于野生型增加了12%(图5-A)。从表面看来,几丁质含量增加的生物学表型不能直接支持*ChsV*的生物学功能被基因敲除破坏。因此继续探究该表型形成的原因。*ChsV*与*ChsVI*在基因组上相邻排列,定量PCR显示,在突变体 $\Delta ChsV$ 中,*ChsVI*表达相对于野生型提高了9.6倍(图5-B)。这样,就可以从大丽轮枝菌细胞产生应激反应,使*ChsVI*表达量增加方面,间接提示*ChsV*的生物学功能被基因敲除破坏。

3 讨论

目前关于大丽轮枝菌致病的分子生物学机制知之甚少。筛选鉴定大丽轮枝菌致病相关基因,对阐明其致病机理至关重要。基因敲除是研究基因功能最直接、最有说服力的实验手段。本文从质粒构建、农杆菌介导转化、转化子的筛选和突变体的分子鉴定四个方面对大丽轮枝菌基因敲除平台做了优化。质粒构建方面,利用融合PCR构建同源重组DNA

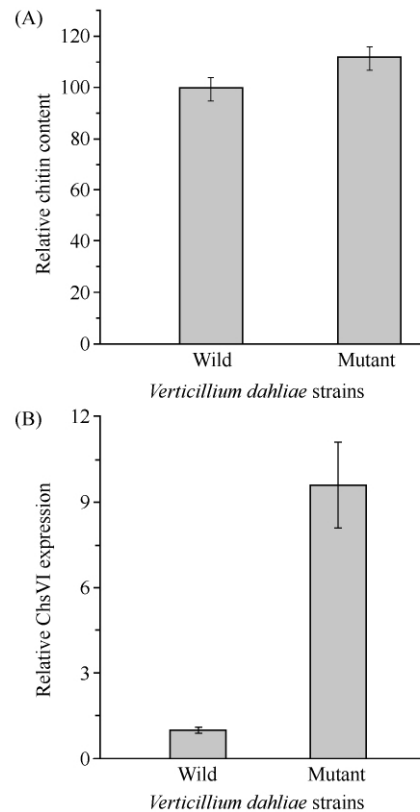


图5 *ChsV*基因敲除突变体表型分析

Fig.5 Phenotype analysis of $\Delta ChsV$. (A) Relative chitin content between wild type and mutation strains. (B) Relative *ChsVI* expression between wild type and mutation strains.

片段,避免了常规的酶切连接实验需要反复做亚克隆的繁琐步骤,使质粒构建可在2 d内完成,提高了工作效率。转化方面,相比传统的原生质体转化,采用了农杆菌介导转化方法,大大提高了转化的效率。转化子的筛选,一直是真菌基因敲除的难点^[10]。本研究将“反向筛选”体系引入大丽轮枝菌,通过两个基因的敲除实验表明基因敲除转化子在总转化子中的比率分别达到87%和44%,这样,筛选少数转化子即可得到基因敲除突变体。研究表明F2dU浓度为50 μmol/L时大丽轮枝菌随机插入转化子无法生长,文献报道使稻瘟病菌和尖孢镰刀菌随机插入转化子死亡的F2dU浓度为0.5 μmol/L^[4],说明不同真菌随机插入转化子对F2dU敏感性不同,在实验前必须先进行参数优化。在分子生物学鉴定突变体方面,常规的突变体鉴定通常是对理论上被同源重组替换掉的基因组区段进行PCR扩增或Southern杂交,但是PCR没有条带可能会另有原因(比如PCR反应条件不合适),造成假阳性的产生;而Southern杂交实验较为耗时,不适用于大量转化子的分子鉴定。本文根据被替换区域之外的序列设计引物,通过观察扩增条带的大小来筛选转化子,降低了PCR产生假阳性的可能,同时可以方便地将基因敲除转化子与T-DNA随机插入的转化子区分开^[11]。

同时也注意到,仍有转化子经分子验证后被证明是T-DNA随机插入的转化子。这种情况在敲除基因*ADE4*和*ChsV*时出现概率分别为2/15=13%和9/16=56%。究其原因,一是可能由于T-DNA在转化中会有截短(truncate)的现象发生,使*HSVtk*基因缺失;二是在某些情况下,*HSVtk*基因无法高效表达。因此继续改进大丽轮枝菌基因敲除平台,可能还需要一是将*HSVtk*基因克隆在T-DNA不易发生缺失的区段,二是利用大丽轮枝菌自身的强启动子使*HSVtk*基因高效表达。

参考文献

[1] Fradin EF, Thomma BP. Physiology and molecular

aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7 (2): 71-86.

- [2] Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98 (15): 8403-8410.
- [3] Gao F, Zhou BJ, Li GY, Jia PS, Li H. A Glutamic acid-rich protein identified in *Verticillium dahliae* from an insertional mutagenesis affects. *Public Library of Science One*, 2010, 5 (12): 15319-15329.
- [4] Khang CH, Park SY, Lee YH, Kang S. A dual selection based, targeted gene replacement tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42 (6): 483-492.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 黄培堂,等译. 第三版. 北京:科学出版社, 2002: 1595-1605.
- [6] Hooykaas P, Roobol C, Schilperoort R. Regulation of the transfer of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology*, 1979, 110 (1): 99-109.
- [7] Mullins ED, Kang S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58 (14): 2043-2052.
- [8] Soulie MC, Perino C, Piffeteau A, Choquer M, Malfatti P, Cimerman A, Kunz C, Boccara M, Vidal-Cros A. *Botrytis cinerea* virulence is drastically reduced after disruption of chitin synthase class III gene (*Bcchs3a*). *Cellular Microbiology*, 2006, 8 (8): 1310-1321.
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} Method. *Methods*, 2001, 25 (4): 402-408.
- [10] 林春花,郑服丛. 稻瘟菌*MgORP1*基因敲除突变株的构建及其表型分析. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(9): 1160-1167.
- [11] Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Dominguez Y, Scazzocchio C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41 (11): 973-981.

High efficient gene knockout in *Verticillium dahliae*

Li Tian , Jieyin Chen , Jiani Wang , Jinlong Wang , Xiaofeng Dai*

Institute of Crop Science , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing 100081 , China

Abstract: [Objective] We developed an efficient method of gene knockout in *Verticillium dahliae* , an important soil-borne fungal pathogen that causes cotton vascular wilt diseases. [Methods] By using fusion PCR , we constructed gene knockout vectors. By using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and applying a herpes simplex virus thymidine kinase (*HSVtk*) gene in T-DNA as a conditional lethal gene to counter-select against ectopic transformants , we developed an efficient method to select gene knockout transformants. [Results] Gene knockout frequency for *ADE4* and *ChsV* was 87% and 44% , respectively. [Conclusion] We developed an efficient tool for gene knockout in *Verticillium dahliae* , which would help clarify the infection mechanism of this fungal pathogen.

Keywords: *Verticillium dahliae* , gene knockout , fusion PCR , *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation , lethal gene , 5-fluoro-2'-deoxyuridine (F2dU)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Basic Program of Science and Technology (SB2007FY027) and by the National Transgenic Major Program (2008ZX08005-002)

* Corresponding author. Tel: +86-10-62815976; E-mail: dxf@caas.net.cn

Received: 18 January 2011 / Revised: 7 March 2011

厦门大学出版社书讯

赤潮控制微生物学——厦门大学南强丛书第五辑

郑天凌 等/著; 978-7-5615-3848-7; ¥48.00; 2011年4月 出版



内容简介: 本书针对全球水体富营养化问题, 聚焦于赤潮生消过程中微生物的特殊地位与作用, 旨在挖掘高效抑/杀藻微生物资源, 积极阐释其调控藻华、防治有害赤潮的途径、机理及方法。全书内容由三篇组成, 第一篇为概论, 主要介绍赤潮及赤潮成因的研究进展; 第二篇重点探讨海洋中的有效抑/杀藻微生物(细菌、放线菌及病毒)及其活性成分对有毒藻的作用方式与过程和赤潮发生水域菌-藻关系问题; 最后一篇简要叙述了赤潮防治的现状与研究展望。

本书主要读者对象包括水生生态学、微生物学、藻类学、海洋生态学、水产养殖学、海洋环境污染及水体(淡水、海水)富营养化等领域的科技人员与管理人员、高等院校的教师及学生人群。

欢迎各界人士邮购厦门大学出版社各类图书

邮购地址: 厦门市软件园望海路 39 号 厦门大学出版社 邮编: 361005

联系人: 陈进才 (0592-2188509) 吕静琳 (0592-2184866)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> , 欢迎致电索要书目