

绿木霉(*Trichoderma virens*) T23 甲基转移酶基因 *gliN-T* 对胶毒素合成的调控研究

华丽霞^{1,2} 孙佩¹ 蒋秋平^{1,2} 曾华兰^{1,2*} 叶鹏盛^{1,2} 何炼^{1,2} 曾静¹
王明娟¹ 张敏¹ 罗飞¹ 杨晓丫¹ 何晓敏¹ 刘勇¹

(1. 四川省农业科学院 经济作物育种栽培研究所, 四川 成都 610300;
2. 农业农村部西南作物有害生物综合治理重点实验室, 四川 成都 610066)

摘要 为探明绿木霉(*Trichoderma virens*)胶毒素合成的分子调控机制,本研究以绿木霉菌 T23 为研究对象,对农杆菌介导的遗传转化技术(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)进行改良,并利用改良的 ATMT 技术对绿木霉菌 T23 胶毒素合成候选基因簇中的甲基转移酶基因 *gliN-T* 进行基因敲除,通过薄层色谱法及高效液相色谱法分析基因敲除突变体培养液中的胶毒素含量变化情况,明确 *gliN-T* 对胶毒素合成的调控作用。结果表明:在绿木霉菌 T23 分生孢子液中添加终浓度为 15 mg/mL 的细胞壁裂解酶(Glucanex),30 °C 处理 2~3 h 后用于农杆菌介导的遗传转化,每 10⁶ 个孢子转化子数从 0.25 个提高 10 个;利用改良的 ATMT 技术,成功获得基因敲除突变体 $\Delta gliN-T$ 。胶毒素检测结果发现:在野生型 T23 的 24 h 培养液中未产生胶毒素,而在 48、72、96 h 的培养液中均检测到胶毒素;在相同的条件下, $\Delta gliN-T$ 在 4 个生长时期均无法产生胶毒素,表明 *gliN-T* 的缺失抑制了绿木霉菌 T23 胶毒素的合成,说明该基因在胶毒素合成途径中扮演着重要角色。

关键词 农杆菌介导转化; 绿木霉菌; 胶毒素; 甲基转移酶; 基因敲除

中图分类号 S182 文章编号 1007-4333(2020)06-0075-07 文献标志码 A

Regulation effect of methyltransferase gene *gliN-T* on the gliotoxin synthesis regulation in *Trichoderma virens* T23

HUA Lixia^{1,2}, Sun Pei¹, JIANG Qiuping^{1,2}, ZENG Hualan^{1,2*}, YE Pengsheng^{1,2}, HE Lian^{1,2},
ZENG Jing¹, WANG Mingjuan¹, ZHANG Min¹, LUO Fei¹, YANG Xiaoya¹, HE Xiaomin¹, Liu Yong¹

(1. Industrial Crops Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610300, China;

2. Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Southwest of Ministry of Agriculture and Rural affairs, Chengdu 610066, China)

Abstract To understand the molecular regulation mechanism of gliotoxin synthesis in *Trichoderma virens*, *T. virens* strain T23 was used as study material, and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) technology was modified to carry out gene disruption experiment. By using the modified ATMT technology, a methyltransferase gene, *gliN-T*, which belongs to gliotoxin synthesis candidate cluster in T23, was knocked out for further determination of its regulation effect on gliotoxin synthesis. Thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography were adopted to analyze the dynamic change of gliotoxin in the culture medium of the gene knockout mutant. The results showed that: By adding cell wall lyase glucanex with a final concentration of 15 mg/mL to T23 conidia and treated at 30 °C for 2~3 h, the number of transformants was increased from 0.25 to 10 per 10⁶ spores, and the

收稿日期: 2019-11-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31701830);国家重点研发专项(2017YFD0201103);四川省农业科学院领军人才研究基金(2019LJRC036)

第一作者: 华丽霞,副研究员,主要从事生物防治、微生物重要基因功能研究,E-mail:newpage@stu.scau.edu.cn

通讯作者: 曾华兰,研究员,主要从事经济作物植物保护研究,E-mail:zh10529@126.com

knockout mutant $\Delta gliN-T$ was successfully obtained. Gliotoxin analysis results showed that: No gliotoxin was produced in the 24 h culture of wild-type T23, but gliotoxin was then detected in the culture medium after 48, 72 and 96 h; Under the same conditions, gliotoxin wasn't detected in $\Delta gliN-T$ at these four growth stages. These results showed that the absence of *gliN-T* inhibited the synthesis of gliotoxin in T23, suggesting that *gliN-T* played an important role in the gliotoxin synthesis regulation.

Keywords *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation; *Trichoderma virens*; gliotoxin; methyltransferase; gene knockout

木霉菌(*Trichoderma* spp.)是研究和利用最广泛的植物病害生防真菌。已有研究表明木霉菌对黄瓜枯萎病菌、辣椒疫霉病菌、棉花立枯丝核菌等多种植物病原真菌具有显著拮抗效果,抑菌率在80%以上^[1-2];木霉菌能增强作物根系活力,对作物的生长具有促进作用^[3-5]。因此,木霉菌在作物病害生物防治、农药减施增效方面具有重要的研究、开发及应用价值。胶毒素(Gliotoxin),简称胶毒素,是一种真菌次生代谢产物,因其对细菌、放线菌以及真菌等具有显著的拮抗作用,已被开发成抗生素或化疗药物^[6]。木霉属中的部分菌种可产生胶毒素,该物质对病毒、细菌等均有抑制效果^[7-8]。

胶毒素合成的分子机制在烟曲霉中研究较为深入:在烟曲霉基因组调控胶毒素合成的基因簇即 *gli* 基因簇中包含了12个基因(*gliA*, *gliC*, *gliF*, *gliG*, *gliK*, *gliM*, *gliN*, *gliJ*, *gliI*, *gliH*, *gliZ*, *gliT*)共同调控着烟曲霉胶毒素的合成^[9],目前,簇内 *gliP*、*gliC*、*gliZ*、*gliA*、*gliT*在烟曲霉胶毒素合成途径中的作用已经较为清晰^[10-14]。已有研究表明绿木霉菌(*Trichoderma virens*)中的部分菌株可产生胶毒素,并通过脉冲标记明确了绿木霉菌液体培养过程中胶毒素含量的动态变化情况^[15],但是绿木霉菌胶毒素合成分子调控机制方面的研究远远滞后于烟曲霉胶毒素的研究。虽然 Vargas 等^[16]对 *T. virens* 菌株 Gv29-8 中的 *gliP* 基因进行基因敲除,明确了该基因与绿木霉菌胶毒素的合成有关,然而,在分子水平上深入剖析绿木霉菌胶毒素合成的分子调控机制仍需要进行大量的科研工作。因此,开展绿木霉菌胶毒素合成基因的克隆及功能研究,有利于对胶毒素合成代谢的分子调控机制进行深入研究,有利于从分子水平上阐明木霉生防菌的拮抗机理,为进一步开发和应用提供重要的理论基础。

本研究室前期通过生物信息学方法,发现绿木霉菌 T23 基因组中存在1个与烟曲霉胶毒素合成基因簇有同源性的基因簇,簇内有8个候选基因,分别命名为 *gliP-T*、*gliC-T*、*gliN-T*、*gliK-T*、*gliI-T*、

gliG-T、*gliF-T*、*gliM-T*^[17]。为进一步研究绿木霉菌胶毒素合成的分子调控机制,本研究拟以绿木霉菌 T23 为研究对象,通过改良的农杆菌介导的遗传转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)技术,对 T23 胶毒素合成基因簇内编码带甲基转移酶结构蛋白的 *gliN-T* 基因进行敲除,分析基因敲除突变体中胶毒素含量变化情况,明确 *gliN-T* 对胶毒素合成的调控作用,为后续的胶毒素代谢调控机制的深入剖析提供重要的理论基础,同时为胶毒素的进一步开发利用提供参考信息。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验菌为生防绿木霉菌 T23,由本研究室从川产道地中药材根际土样中分离得到^[18]。

细胞壁裂解酶 Glucanex (Sigma-Aldrich, L1412, 美国); E. Z. N. A.® Fungal DNA Kit (Omega Biotek, D3390=01, 美国);胶毒素标准品(1 mg, Lot number: 1D0E12, 纯度>99%, 青岛普瑞邦生物工程有限公司);高效硅胶 GF254 预制板(青岛海洋化工有限公司);试验所需引物的合成及测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 仪器设备及试剂

高效液相色谱 1200 型,配紫外检测器 G1314B (安捷伦科技有限公司, 美国); C18 反相色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm, Pribolab, Singapore); 色谱纯甲醇(美国 Fisher);

1.3 培养基及相关试剂

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato dextrose agar, PDA)用于绿木霉菌 T23 的培养; LB 培养基用于大肠杆菌及农杆菌的培养; IM 液体诱导培养基用于 ATMT 诱导转化^[19], 121 °C 高温高压灭菌后,加入终浓度为 200 μmol/L 的乙酰丁香酮;共培养基用于农杆菌和分生孢子的共培养,其配方在 IM 培养基基础上,每升共培养基只需加入葡萄糖 1 g, 加入琼脂粉 15 g, 121 °C 高温高压灭菌后加入终浓

度为 200 μmol/L 的乙酰丁香酮,倒平板待用。

筛选培养基即 PDA 培养基高温高压灭菌后,加入终浓度为 150 μg/mL 的潮霉素 B 后倒平板待用。

1.4 基因敲除载体的构建及转化子的分子鉴定

1.4.1 DNA 提取

将供试绿木霉菌株 T23 活化于 PDA 平板培养基上,培养 2~3 d 后,用接种环挑取新鲜菌丝接种到马铃薯葡萄糖液体培养基(Potato dextrose broth, PDB)中,28 °C 振荡培养 2~3 d,待菌丝体生长茂盛的时候,用灭菌纱布和滤纸过滤收集菌丝体,用纸巾尽量吸干菌丝体中的水分后置于灭菌研钵中,加入液氮研磨至粉末状,然后用 E. Z. N. A.® Fungal DNA Kit(Omega Biotek, D3390=01,美国)进行基因组 DNA 的提取,具体操作依照说明书进行。

1.4.2 基因敲除载体构建及转化子的分子鉴定

按照同源敲除的原理构建基因敲除载体(图 1):分别以 *gliN-T* 的 5'端 1 016 bp (LF)及 3'端 892 bp(RF)作为同源臂;以构巢曲霉启动子

PtrpC 启动的潮霉素基因 (*hph*),即潮霉素表达盒作为基因替换片段,按照 LF::*PtrpC-hph*::RF 的顺序,组装到携带有 CaMV poly(A) 终止子元件的基因敲除载体 pGKO2 中。根据 *PtrpC-hph* 序列设计正反方向引物,即 *hyp-F* 与 *hyp-R*,用于转化子潮霉素盒的检测;同时根据 LF 序列设计正向引物 *gliN-F*,根据 RF 序列设计反向引物 *gliN-R*,用于同源重组转化子的分子鉴定。引物信息见表 1。

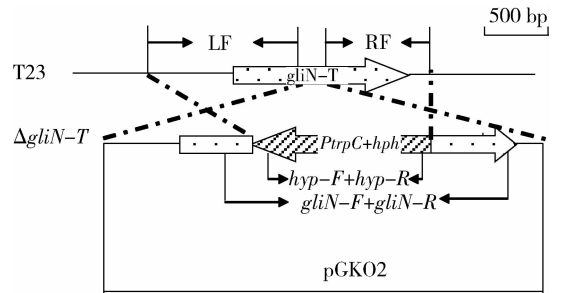


图 1 基因敲除同源置换原理

Fig. 1 Gene knockout strategy based on homologous recombination

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

名称 Name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	退火温度/°C Annealing temperature	预期大小/bp Expected size	目标 Target
<i>gliN</i> L-F	gtcgacgggtatcgataagcttAATTATATATCCGGTATCTGGA ATGTACC	60	1 016	<i>gliN</i> LF
<i>gliN</i> L-R	tttggcaagcTAGTGGAGCACTTCACGCAGG			
<i>hyp</i> -F	tgctccactaGCTTGCCAAAAGTGGTTCCC	58	1 021	<i>ptrpC-hph</i>
<i>hyp</i> -R	cacagattccTGGGAAGTACTCACACATTATTATGGA			
<i>gliN</i> R-F	tgctaacagctgcagccgggGGAATCTGTGCAGCGCAGG	58	892	<i>gliN</i> RF
<i>gliN</i> R-R	cgcggtggcgccgctctagaCTGTTAGCAGCTTACTCTTA CATACCAG			
<i>gliN</i> -F	CCGACCGTATCGACCTCTAC	58	1 006/2 346 *	转化子分子鉴 定及表达分析
<i>gliN</i> -R	ATGGCCGACGAGCAACTCC			

注:引物序列 5'末端的小写字母为无缝拼接所需的同源重组序列;*,野生型和突变体扩增片段大小。

Note: Lowercase letters on the 5'-end present the homology of the adjacent fragment for vector construction using seamless cloning;

*, length of PCR fragments of wild type and mutant.

1.5 农杆菌介导的遗传转化技术的改良

1)取携带有基因敲除构建体的阳性农杆菌

C58C1 在 LB 培养基上划线,28 °C 培养 36 h,挑取单菌落到带抗生素的 LB 液体培养基中,28 °C 振荡

培养过夜,离心收集菌体,随后用IM诱导培养基(含终浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 的乙酰丁香酮)重悬浮菌体并调节OD600至0.2~0.3,然后28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养6 h,备用。

2)绿木霉分生孢子悬浮液的制备:在PDA培养基上活化绿木霉菌株T23,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养4 d左右至产孢,用灭菌水轻轻地刮洗菌面,3层擦镜纸过滤菌丝,4 000 r/m离心5~10 min收集分生孢子。倒掉上清,加入细胞壁裂解酶Glucanex(终浓度为15 mg/mL,溶于0.7 mol/L NaCl溶液),30 $^{\circ}\text{C}$ 80 r/m振荡培养2.5~3.0 h,4 000 r/m离心,用0.7 mol/L NaCl溶液清洗1~2遍,3层擦镜纸过滤收集分生孢子液,调节分生孢子浓度至 10^6 个/mL。

3)取等体积(200 μL)的农杆菌菌液及孢子悬浮液进行混合后均匀涂布于共培养平板培养基中,22 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养3 d。随后,在共培养好的平板上倒1层含潮霉素(终浓度150 $\mu\text{g/mL}$)及头孢抗生素(终浓度400 $\mu\text{g/mL}$)的PDA筛选培养基,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养5 d左右,挑取能在筛选培养基上生长的转化子到新的筛选培养基中,进行潮霉素稳定性鉴定。

1.6 基因表达分析

参照已有报道^[17]提取野生型T23和基因敲除突变体 $\Delta gliN-T$ 的总RNA并进行反转录,合成cDNA第一链。在 $gliN-T$ 基因外显子区域设计引物,在转录组水平上检测 $gliN-T$ 在突变体中的表达情况。引物详细信息见表1。

1.7 胶毒素的提取及检测

1.7.1 薄层色谱分析

将供试菌株接种到100 mL PDB培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养48 h,用孔径为0.22 μm 的滤膜过滤培养液,取20 mL滤液,加入等体积的乙酸乙酯萃取2次,合并萃取液,置于通风橱中挥干得到待测样品后用2 mL甲醇溶解作为薄层鉴别供试品。取胶毒素对照品1 mg,加入2 mL甲醇溶液,超声5 min,得到浓度为0.5 mg/mL的胶毒素标准品溶液,作为薄层分析的对照品溶液。以高效硅胶GF254预制板作为薄层板,以正己烷-乙酸乙酯体积比为6:6作为展开剂,在254 nm的紫外光下观察薄层板的展开情况,随后用碘蒸汽对薄层板进行显色。

1.7.2 高效液相色谱检测

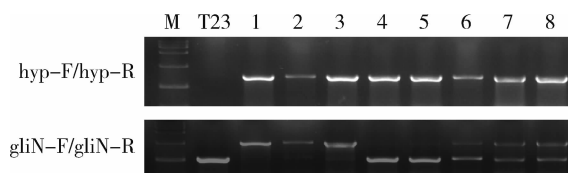
挑取新鲜菌丝接种至200 mL PDB培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 中震荡培养48 h后取2 mL培养液并用0.22 μm 微孔滤膜过滤至进样瓶中待用。按照以下

的色谱条件对培养液中的胶毒素进行检测:以水为流动相A,甲醇为流动相C,按照50%水加50%甲醇进行等度洗脱;流速:1 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:20 μL ;检测波长:254 nm。

2 结果与分析

2.1 通过改良的ATMT技术获得 $gliN-T$ 基因敲除突变体

在细胞壁溶解酶Glucanex处理试验前,共进行了3批次的遗传转化试验共筛选到3个转化子。分子鉴定结果表明这3个转化子均为异位整合转化子。在分生孢子液中添加终浓度为15 mg/mL的细胞壁溶解酶Glucanex进行处理后,筛选得到22个转化子,潮霉素基因检测阳性率为100%,基因特异引物鉴定结果见图2:在22个转化子中:有3个是同源重组转化子,即成功敲除 $gliN-T$ 的基因敲除突变体 $\Delta gliN-T$;有2个转化子检测到潮霉素基因,但检测不到同源敲除的条带,为非正常转化子;其余17个是异位整合转化子。对溶解酶处理前后的试验结果进行比较分析,发现绿木霉菌T23分生孢子经细胞壁溶解酶Glucanex处理后,平均每毫升分生孢子液的转化子数从0.25个提升到10.00个,转化效率大大提高(表2)。



M:DL15000;T23:野生型T23 DNA扩增产物;1~8:基因敲除转化子DNA扩增产物(1~3为同源重组阳性转化子,4~5为非正常转化子,6~8为异位整合转化子)。

M: DL15000; T23: amplicon from wildtype T23 gDNA; 1-8 are amplicons from transformants gDNA: 1-3 represent homologous transformants; 4-5 are unusual transformants; 6-8 are ectopic transformants.

图2 Glucanex处理后获得的转化子的分子鉴定

Fig. 2 Molecular identification for transformants after glucanex treatment

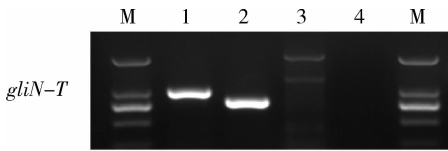
2.2 $gliN-T$ 在基因敲除突变体中的表达分析

对野生型T23及基因敲除突变体 $\Delta gliN-T$ 中的 $gliN-T$ 进行RT-PCR表达分析,结果表明:在野生型T23基因组及cDNA中均检测到 $gliN-T$ 的表达;在转录水平上,在基因敲除突变体 $\Delta gliN-T$ 中检测不到 $gliN-T$ 的表达(图3),意味着 $gliN-T$ 基因被成功敲除。

表 2 Glucanex 处理前后木霉菌 T23 ATMT 转化效果比较

Table 2 Comparison of transformant efficiency before and after Glucanex treated for T23

处理 Treatment	共培养分 生孢子数 No. of conidia for co-culture	T-DNA 插入 转化子/个 No. transformants with T-DNA insertion	同源重组 转化子/个 No. of homologous recombination transformants	每毫升分生孢子 液转化子/个 No. of transformants for ml ⁻¹ conidia suspension	同源重组 效率/% Homologous recombination efficiency
对照 CK	12×10 ⁶	3.00	0.00	0.25	0.00
细胞壁溶解酶处理 Glucanex treatment	2×10 ⁶	20.00	3.00	10.00	30.00



M:DL2000; 1:T23 gDNA 扩增产物; 2:T23 cDNA 扩增产品; 3:Δ*gliN-T* cDNA 扩增产物; 4:阴性对照,以 H₂O 为模板的扩增产物。

M, DL2000; 1, amplicon from T23 gDNA; 2, amplicon from T23 cDNA; 3, amplicon from Δ*gliN-T* cDNA; 4, amplicon from H₂O as negative control.

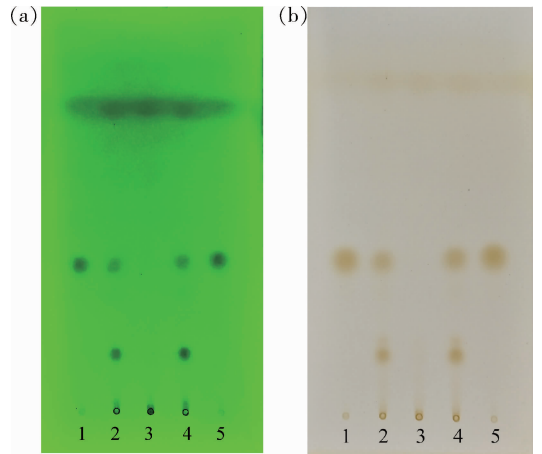
图 3 *gliN-T* 在基因敲除突变体 Δ*gliN-T* 中的表达分析

Fig. 3 Expression analysis for *gliN-T* in gene knockout mutant Δ*gliN-T*

2.3 *gliN-T* 基因敲除突变体胶毒素代谢产物的检测

对野生型与基因敲除突变体 Δ*gliN-T* 的 48 h 的培养液进行薄层色谱分析,胶毒素标准品上样量为 5 μL,供试样品上样量为 10 μL。薄层色谱分析结果表明,在野生型 T23 48 h 培养液中可检测到胶毒素(图 4,泳道 2 和 4);而相同培养条件下,基因敲除突变体 Δ*gliN-T* 的培养液则无法检测到胶毒素(图 4,泳道 3)。

为了进一步明确胶毒素的分泌是否与菌丝生长时期有关,本研究对不同培养时期(24、48、72 和 96 h)的野生型 T23 及基因敲除突变体 Δ*gliN-T* 的菌丝培养液分别进行了高效液相色谱检测。检测结果发现,在 28 °C,120 r/m 的培养条件下,培养 24 h 时,野生型 T23 培养液中检测不到胶毒素,在 48、72、96 h 的培养液中均检测到胶毒素;而在相同的培养条件下,基因敲除突变体 Δ*gliN-T* 在 4 个生长时期的培养液中均未检测到胶毒素(表 3)。



(a) 薄层板在 254 nm 紫外光下的薄层检测结果;(b) 经过蒸汽碘显色后的薄层色谱图

1 和 5:胶毒素标准品; 2 和 4:野生型 T23 培养液萃取样品; 3:突变菌株培养液萃取物。

(a) chromatography under 254 nm UV light; (b) chromatography after vapor iodine staining

1 and 5, gliotoxin standard substrate; 2 and 4, extraction from wild type T23; 3, extraction from Δ*gliN-T*.

图 4 薄层色谱法检测 T23 及突变体胶毒素

Fig. 4 Gliotoxin detection by TLC for T23 and Δ*gliN-T*

表 3 高效液相色谱检测不同时间段培养液中的胶毒素含量

Table 3 Gliotoxin detection for different time-period culture filtrate by HPLC mAU · S

菌株 Strain	培养时间/h Culture time			
	24	48	72	96
T23	—	436.30	401.99	240.34
Δ <i>gliN-T</i>	—	—	—	—

注:“—”表示在相同液相色谱条件下未检测到峰值。

Note: — represents no peak is detected under the same HPLC condition.

3 讨论与结论

高效率的基因敲除技术是进行丝状真菌基因功能研究的重要生物技术之一。目前应用于丝状真菌基因敲除的转化技术包括分生孢子电击转化^[20]、基于菌丝原生质体的 PEG/CaCl₂ 转化^[21]、基因枪转化及农杆菌介导的遗传转化(ATMT)^[22]等。其中, ATMT 技术因成本低、操作简单、转化效率高、遗传稳定等优点已经被广泛应用到各类丝状真菌的遗传转化中^[23]。农杆菌介导的遗传转化技术虽然已经在绿木霉菌(*T. virens*)中有成功应用的报道^[24-25], 但是转化效率低, 大大限制了 *T. virens* 重要基因的功能验证及开发利用。本研究对 ATMT 技术进行改良, 在 *T. virens* T23 的分生孢子液中添加细胞壁溶解酶, 转化效率是对照组的 40 倍, 并通过改良的 ATMT 技术获得胶毒素合成候选基因 *gliN-T* 的基因敲除突变体, 这将为深入研究 *T. virens* T23 胶毒素合成的分子调控机制提供了强有力的技术支持。

甲基转移酶是一类普遍存在于生物体内的重要酶类, 参与生物体的甲基化反应, 对生物体次生代谢产物的合成具有重要的调控作用^[26-27]。在烟曲霉胶毒素合成基因簇内存在着 2 个甲基转移酶基因(*gliN* 及 *gliM*), 但是, 尚未见有关烟曲霉胶毒素合成基因簇内甲基转移酶基因的功能研究报道。

本研究利用改良的 ATMT 技术对 *gliN-T* 进行基因敲除并获得突变体, 发现敲除 *gliN-T* 基因后, *T. virens* T23 胶毒素的合成受到抑制, *gliN-T* 参与了调控 T23 胶毒素的合成。在胶毒素合成基因簇内存在着 *gliN-T* 及 *gliM-T* 2 个甲基转移酶基因, 这 2 个基因甲基化底物是否相同? 其在调控胶毒素合成途径中各扮演着什么角色? 这些问题有待深入探索。

参考文献 References

[1] 曹玉桃. 对几种病原菌拮抗木霉的筛选和菌种改良[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007
Cao Y T. Screening anti-*Trichoderma* to several kind of pathogenic germs and improve strains [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2007 (in Chinese)

[2] 韩长志. 植物病原拮抗菌木霉属真菌的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 946-952
Han C Z. Advances in utilization of antagonistic *Trichoderma*

spp against plant pathogens [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 32(4): 946-952 (in Chinese)

[3] Howell C R. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases[J]. *Phytopathology*, 2006, 96(2): 178-180

[4] 张春秋, 马光恕, 廉华, 李梅, 蒋细良, 宿晓琳, 刘明鑫, 曲虹云. 木霉对黄瓜幼苗生理特性及枯萎病防治效果的影响[J]. 植物保护, 2018, 44(5): 238-246
Zhang C Q, Ma G S, Lian H, Li M, Jiang X L, Su X L, Liu M X, Qu H Y. Effect of *Trichoderma* on physiological characteristics of cucumber seedlings and control effect against *Fusarium wilt*[J]. *Plant Protection*, 2018, 44(5): 238-246 (in Chinese)

[5] 叶冰竹, 翟欣, 秦路平, 韩婷. 深绿木霉 D16 生物菌肥对丹参生长和次生代谢的影响[J]. 药学实践杂志, 2019, 37(3): 216-221
Ye B Z, Zhai X, Qin L P, Han T. Effects of fungal biofertilizer from *Trichoderma atroviride* D16 on the growth and secondary metabolism of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Journal of Pharmaceutical Practice*, 2019, 37(3): 216-221 (in Chinese)

[6] Waring P, Beaver J. Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines[J]. *General Pharmacology: The Vascular System*, 1996, 27(8): 1311-1316

[7] Brian P W, Hemming H G. Gliotoxin, a fungistatic metabolic product of *Trichoderma viride* [J]. *Annals of Applied Biology*, 1945, 32(3): 214-220

[8] 刘路宁. 绿木霉(*TRICHODERMA VIRENS*)TY009 菌株胶毒素分离纯化及绿色荧光蛋白标记研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008
Liu L N. Isolation and purification of gliotoxin from *Trichoderma virens* strain TY009 and its GFP-labeling [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008 (in Chinese)

[9] Gardiner D M, Howlett B J. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 248(2): 241-248

[10] Chang S L, Chiang Y M, Yeh H H, Wu T K, Wang C C C. Reconstitution of the early steps of gliotoxin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* reveals the role of the monooxygenase *GliC*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23(7): 2155-2157

[11] Dolan S K, O'Keefe G, Jones G W, Doyle S. Resistance is not futile: gliotoxin biosynthesis, functionality and utility[J]. *Trends in Microbiology*, 2015, 23(7): 419-428

[12] Bok J W, Chung D, Balajee S A, Marr K A, Andes D, Nielsen K F, Frisvad J C, Kirby K A, Keller N P. *GliZ*, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence [J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(12): 6761-6768

[13] Sugui J A, Pardo J, Chang Y C, Zarembek K A, Nardone G,

- Galvez E M, Müllbacher A, Gallin J I, Simon M M, Kwon-Chung K J. Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: *gliP* deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone[J]. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(9): 1562-1569
- [14] Wang D N, Toyotome T, Muraosa Y, Watanabe A, Wuren T, Bunsupa S, Aoyagi K, Yamazaki M, Takino M, Kamei K. GliA in *Aspergillus fumigatus* is required for its tolerance to gliotoxin and affects the amount of extracellular and intracellular gliotoxin[J]. *Medical Mycology*, 2014, 52(5): 506-518
- [15] Wilhite S E, Straney D C. Timing of gliotoxin biosynthesis in the fungal biological control agent *Gliocladium virens* (*Trichoderma virens*) [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, 45(4): 513-518
- [16] Vargas W A, Mukherjee P K, Laughlin D, Wiest A, Moran-Diez M E, Kenerley C M. Role of gliotoxin in the symbiotic and pathogenic interactions of *Trichoderma virens* [J]. *Microbiology*, 2014, 160(10): 2319-2330
- [17] 华丽霞, 何炼, 蒋秋平, 曾华兰, 叶鹏盛, 张敏, 刘朝辉, 韦树谷. 木霉菌 T23 胶毒素合成基因的生物信息学分析与克隆[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(3): 1079-1086
Hua L X, He L, Jiang Q P, Zeng H L, Ye P S, Zhang M, Liu Z H, Wei S G. Bioinformatic analysis and cloning of gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Trichoderma* T23[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(3): 1079-1086 (in Chinese)
- [18] 曾华兰, 叶鹏盛, 李琼芳. 中药材土传病害拮抗木霉的筛选与应用初探[J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(4): 386-388
Zeng H L, Ye P S, Li Q F. Study on the control of medicinal herbs' soil-borne disease by *Trichoderma* spp[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2002, 17(4): 386-388 (in Chinese)
- [19] 叶小波. 根瘤农杆菌介导哈茨木霉遗传转化体系优化及突变体筛选[D]. 昆明: 云南农业大学, 2009
Ye X B. Optimizing the protocol for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Trichoderma harzianum* and mutants screening [D]. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2009 (in Chinese)
- [20] Chakraborty B N, Patterson N A, Kapoor M. An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1991, 37(11): 858-863
- [21] Deane E E, Whipps J M, Lynch J M, Peberdy J F. Transformation of *Trichoderma reesei* with a constitutively expressed heterologous fungal chitinase gene[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 24(7): 419-424
- [22] Ruiz-Díez B. Strategies for the transformation of filamentous fungi[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(2): 189-195
- [23] de Groot, M J, Bundock P, Hooykaas P J, Beijersbergen A G. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of filamentous fungi[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(9): 839-842
- [24] 方卫国, 张永军, 杨星勇, 裴炎. 根瘤农杆菌介导真菌遗传转化的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2002, 22(5): 40-44
Fang W G, Zhang Y J, Yang X Y, Pei Y. Transformation in fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Journal of Chinese Biotechnology*, 2002, 22(5): 40-44 (in Chinese)
- [25] 范亮波, 李梅, 冀颖, 刘卫德, 蒋细良. 根瘤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 L B, Li M, Ji Y, Liu W D, Jiang X L. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and its application in *Trichoderma* spp[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(3): 1-5, 12 (in Chinese)
- [26] Morishige T, Tamakoshi M, Takemura T, Sato F. Molecular characterization of *O*-methyltransferases involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica* [J]. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 2010, 86(7): 757-768
- [27] Siegrist J, Netzer J, Mordhorst S, Karst L, Gerhardt S, Einsle O, Richter M, Andexer J N. Functional and structural characterisation of a bacterial *O*-methyltransferase and factors determining regioselectivity[J]. *FEBS Letters*, 2017, 591(2): 312-321

责任编辑: 杨爱东