

稻瘟菌突变体 T-DNA 插入位点的精细定位和插入模式的研究

林春花², 贺春萍¹, 王葵娣², 廖奇亨², 郑服丛^{1,2*}

(¹中国热带农业科学院环境与植物保护研究所 儋州 571737)

(²华南热带农业大学环境与植物保护学院 儋州 571737)

摘 要 随机挑取已构建的 37 个稻瘟菌 T-DNA 突变株, 利用 TAIL-PCR 技术扩增出 T-DNA 插入位点的侧翼序列, 测序并进行比对分析。结果显示: 成功获得扩增产物并测序的序列共有 39 条, T-DNA 边界序列为稻瘟菌序列的有 19 条, 其余 20 条为载体主干序列。在这有效扩增为稻瘟菌序列的 19 条中, 有 10 条是 T-DNA 右侧翼序列与稻瘟菌序列, 9 条为左侧翼序列加稻瘟菌序列。分析 T-DNA 剪切位点, 10 条右侧翼序列中有 9 条的剪切位点相同, 这与农杆菌介导 T-DNA 转化植物一样。而左边界的剪切位点就没有这种规律性。研究也精细确定了 17 个不同突变株的 T-DNA 插入位置, 为后续的基因功能研究奠定基础。

关键词: 稻瘟菌; T-DNA; TAIL-PCR; 序列分析

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0588-05

稻瘟菌 [*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, 无性世代为 *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.] 是水稻严重病害——稻瘟病的病原真菌^[1]。稻瘟菌的致病分子遗传学研究可以为稻瘟病的有效、安全控制提供参考。稻瘟菌的基因组测序已经完成, 大规模 BAC 库的构建以及 EST 的测序正在进行中^[2,3]。但迄今为止, 稻瘟菌的基因及其蛋白质序列的功能大部分是假定的, 缺乏试验证据。目前, 国内外从事稻瘟菌分子生物学的实验室都在致力于通过插入标记和表型筛选寻找稻瘟菌的基因功能。方法之一就是利用农杆菌介导 T-DNA 转化技术, 并利用质粒拯救 (Plasmid rescue) 或 TAIL-PCR 技术对相关突变体加以定位^[4], 进一步利用表型互补等方法对稻瘟菌基因进行功能研究。

自 1995 年 Bundock 等首次成功进行根癌农杆菌介导酵母菌的遗传转化以来, 到目前为止已在多种真菌上获得成功^[5,6]。但该系统许多具体环节特别是 T-DNA 整合机制还不十分清楚。近来, 一些学者试图对 T-DNA 整合植物的复杂机制进行解释, 如拟南芥、烟草以及水稻^[7]。T-DNA 在整合植物时, 右边界往往都在一个位点剪切, 而左边界具有不同程度的缺刻和剪切^[8-10]。并且在对 T-DNA 整合是否具有一定的偏好性, 一直存在争论。

本研究小组利用农杆菌为介导将含抗潮霉素基

因的 T-DNA 插入稻瘟菌菌株 Y34 基因组中, 建立起群体数量为 6855 个突变体的 T-DNA 标签库。并从该库中随机挑选部分突变体, 利用 TAIL-PCR 法扩增插入位点的侧翼序列, 对扩增产物进行测序分析, 并与稻瘟菌 70-15 菌株的基因组数据库进行比对分析。结果证实了 T-DNA 在稻瘟菌基因组中的整合左右边界有典型的不同的剪切方式, 同时认为其对稻瘟菌插入位点的碱基可能有一定的偏好性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养条件: 参试突变体共 37 个: Y34-0005, Y34-0025, Y34-0066, Y34-0121, Y34-0122, Y34-0133, Y34-0144, Y34-0145, Y34-0172, Y34-0173, Y34-0174-1, Y34-0178, Y34-0180, Y34-0195, Y34-0211, Y34-0528-1, Y34-0528-2, Y34-0588, Y34-0601, Y34-0611, Y34-0619, Y34-0635, Y34-0642, Y34-1001, Y34-1019, Y34-1021, Y34-1414, Y34-1252, Y34-1469, Y34-1496, Y34-1555, Y34-1707, Y34-1736, Y34-1831, Y34-1824, Y34-1847, Y34-3025。这些突变体是本实验室以稻瘟菌 Y34 菌株(来自我国云南省)利用农杆菌介导的 T-DNA 转化技术得到。将 Y34 菌株和突变体移接于燕麦培养基上, 28℃ 培养, 一定时间后收集分生孢子和菌丝, 并将其转入 V8 液体培养基中,

基金项目: 国家自然科学基金(30260046)

* 通讯作者。Tel: 86-898-23300371 E-mail: zhengfucong@126.com

作者简介: 林春花(1980-), 女, 福建屏南县人, 博士研究生, 研究方向为分子植物病理学。E-mail: lin3286320@126.com

收稿日期: 2006-11-14, 接受日期: 2006-12-31, 修回日期: 2007-03-21

28℃摇菌,待菌液中出现丰富的菌丝体时,过滤收集菌丝体,备用。

1.1.2 培养基 ①燕麦培养基 称取 50g 燕麦片,加入适量蒸馏水,煮沸 30min,两层纱布过滤后,加 30g 琼脂粉,用蒸馏水补水至 1000mL,并调 pH 至 6~6.5,然后分装,100kPa 高压灭菌 20min。②V8 液体培养基:市购 V8 汁每罐(354mL)加入 5g CaCO₃,在磁力搅拌器上搅拌 30min,4 层纱布过滤,滤液用蒸馏水补水至 1200mL,分装,100kPa 高压灭菌 20min。

1.1.3 试剂和其他 潮霉素 B (Hygromycin B) 购自德国 Roche 公司,卡那霉素 (Kanamycin),利福平 (Rifampicin),头孢霉素 (cefotaxime),四环素 (tetracycline) 和链霉素 (streptomycin) 购自 Sigma 公司; QIAquick Gel Extraction Kits 购自 QIAGEN 公司; DNA Marker, Taq DNA 聚合酶及限制性内切酶购自 TAKARA 公司; T-载体系统 pGEM-T Easy Vector Systems 购自 Promega 公司; 引物由上海生工生物工程技术服务公司合成; 测序由上海基康生物技术有限公司完成。

1.2 DNA 提取和突变体 T-DNA 插入的分子检测

参照 Talbot 等^[11]的方法,以菌丝体为材料,分别提取各参试菌株的基因组 DNA。突变体 T-DNA 插入采用 PCR 法和 Southern 法检测,详见参考文献 [12]。

1.3 致病相关突变体插入位点侧翼序列的克隆和测序

用 TAIL-PCR 扩增参试突变体 T-DNA 插入位点的侧翼序列。特异引物的设计和 PCR 参照 Mullins 等^[13]的方法。简并引物选用 AD4: 5'-TG(A/T)GNAG(A/T)ANCA(G/C)AGA-3', AD8: 5'-(G/C)TTGNTA(G/C)JINCTNTGC-3'; AD9: 5'-(A/T)CAGNTG(A/T)JINGTNTCTG-3'。

TAIL-PCR 包括 3 个反应。第一轮反应(20μL)体系包含 10× 的 PCR 缓冲液(MgCl₂ Plus)₂μL, 2.5mmol/L 的 dNTP 1.5μL, 20μmol/L 特异引物 0.2μL, 20μmol/L 的 AD4(AD8 或 AD9)3.2μL, Taq DNA 聚合酶(5U/μL)0.1μL, 突变体基因组 DNA 1μL; 第二轮反应(20μL)的特异引物比第一轮的特异引物、第三轮反应(20μL)的特异引物比第二轮的特异引物向插入序列的末端靠拢一定距离,简并引物的序列不变,但用量减少至 1.6μL,模板为其前一轮产物的 100× 稀释液(2μL),其它反应物同第一轮。

第三轮 TAIL-PCR 产物按照胶回收试剂盒说明书进行目的片段的回收。回收片段与载体 pGEM-T

Easy Vector 连接。重组质粒用电击转化法导入宿主的感受态细胞。取阳性克隆,测序。

1.4 扩增产物序列分析

用 DNASTar 软件分析取得的测序资料;分析 T-DNA 边界剪切位点,在稻瘟病菌基因组数据库中进行 BLAST 搜索,分析突变体 T-DNA 插入位点的碱基。

2 结果和分析

2.1 突变体插入位点的侧翼序列的克隆

TAIL-PCR 的扩增结果,第一次扩增结果得到的非特异性产物较多,特异性扩增条带一般不能检测到。因此,我们只取第二次和第三次 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。由于特异引物是嵌套的,第三个特异引物的互补位置比第二个特异引物向插入序列末端靠拢约 80bp,而简并引物保持不变(即与突变体的基因组 DNA 互补位置理论上应该不变),所以第三次 PCR 扩增比第二次的片段理论上应该小一些(突变体 Y34-1001 的结果见图 1,其余略)。

将第三轮 TAIL-PCR 扩增得到的特异条带回收,与 pGEM-T easy 载体连接,电击转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,经蓝白斑筛选阳性克隆后,用菌液 PCR 法验证插入片段大小相符者,送测序(结果略)。

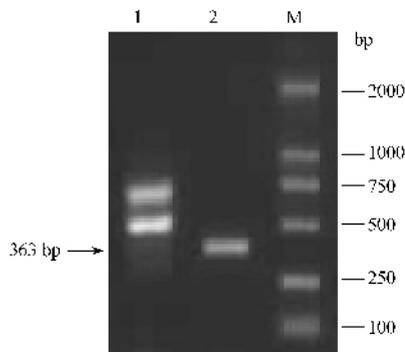


图 1 突变体 Y34-1001 基因组 DNA 的 TAIL-PCR 第二和第三轮扩增产物的电泳图谱

Fig.1 Agarose gel electrophoresis patterns of the products from second and third TAIL-PCR of transformant Y34-1001. Lane M is the molecular marker. Lane 1 and 2 are the products of second and third TAIL-PCR.

2.2 稻瘟菌基因组 T-DNA 侧翼序列分析结果

本研究小组共将 49 条 TAIL-PCR 产物(除了参试验菌株的 39 条 TAIL-PCR 产物外,还有其他稻瘟菌突变株,参试菌株中未列出)寄去测序,有 39 个测序成功,10 个测序失败。

经比对分析,39 个测序成功的片段中,有 19 个序列与稻瘟病菌基因组数据库的 70-15 菌株基因组高度同源,同源性均在 94% 以上,表明这 19 个序列

是参试的相关突变体的插入突变位置的侧翼序列。而其余 20 个序列为载体质粒序列, 约占所有测序成功序列的比例为 51.3%。上述 19 个 TAIL-PCR 特异扩增片段相对应的突变体、在稻瘟菌 70-15 基因组上的位置等数据见表 1。

从 Y34-0121 和 Y34-0588 分别扩增到 295bp 和 191bp 的特异片段。经比对, 191bp 片段与 295bp 的前 191bp 序列完全相同, 表明 2 个片段扩增自突变体的相同起点位置, 同时也表明这两个突变体的插入位置相同。与稻瘟菌数据库比对, 295bp 片段与稻瘟菌 II 号染色体 supercontig 5.184 的 404054 ~ 404317bp 序列相似性达到 94%, 据此推知插入位置在该重叠群的 404054bp 处, 位于未知蛋白编码基因 MG02065.4 和 MG02064.4 之间。同理, Y34-1001 和 Y34-3025, Y34-0635 和 Y34-0528-2 的插入位点也

相同。

从表 1 中可以看出, 有 9 个突变体 T-DNA 插入位点两端的碱基为 A 和 T 组合, 7 个突变体插入突变体为 A 或 T 与 G 或 C 组合, 只有一个突变体插入位置碱基为有 G 和 C 组合。T-DNA 插入位置两端序列以 A 和 T 居多, 这可能与碱基 A 和 T 配对只需要两个氢键, 而 G 和 C 配对需要 3 个氢键有关。本研究所定位的 17 个突变体中, 有 6 个突变体 T-DNA 插入位点两两相同, 这可能预示着 T-DNA 插入不是随机插入, 而是具有一定的喜好性。另外, 从表中还可以看出, 在有效测序为稻瘟菌的 17 个突变株中, 有 16 个插在 I、II、III、VI 号染色体上, 还有一个插在端粒部位 (Y34-0178)。而稻瘟菌的 V、VI 和 VII 号染色体上确没有。这是否也预示着 T-DNA 不是随机插入?

表 1 19 个 TAIL-PCR 特异扩增的侧翼序列在稻瘟菌 70-15 基因组上的位置

Table 1 Locations of 19 flanking sequences in genome of *Magnaporthe grisea* (isolate 70-15)

Transformants ID	The length of flanking sequence/bp	Identity	Chromosome number	Supercontig number	Position of insertion/bp	Nucleotides of inserted position	Relative gene
Y34-1001	294	98/98(100%) 199/199(100%)	I	5.190	1473919	C/A ^a	MGG_06513.5
Y34-3025	431	98/98(100%) 199/199(100%)					
Y34-1414	451	267/269(99%)	I	5.195	1399425	T/G	MGG_07176.5
Y34-0173	985	876/890(98%)	I	5.196	1183464	A/T	MGG_01572.5
Y34-0121	295	254/268(94%)	II	5.184	404054	A/T	MGG_02065.5
Y34-0588	191	181/192(94%)	II	5.184	404049	T/A	MGG_02064.5
Y34-0619	257	257/257(100%)	II	5.186	1064839	T/T	MGG_09172.5
Y34-0133	608	595/595(100%)	II	5.186	2433208	A/T	MGG_06653.5
Y34-1469	531	475/491(96%)	II	5.186	2433208	A/T	MGG_06653.5
Y34-0145	1128	340/341(99%) 523/529(98%)	III	5.175	1609689	G/A	Intergenic region
	1184	1135/1140(99%)					
Y34-0635	885	879/890(98%)	III	5.175	273960	A/A	MGG_05254.5
	780	767/769(99%)					
Y34-0528-2	543	513/516(99%)	III	5.187	1883318	T/G	MGG_12157.5
Y34-0144	393	392/393(99%)	III	5.187	1883374	T/G	MGG_12157.5
Y34-1252	324	146/147(99%) 57/57(100%)	III	5.187	1883374	T/G	MGG_12157.5
Y34-0211	820	754/756(99%)	VI	5.194	2270855	C/G	MGG_00529.5
Y34-0195	983	631/647(97%)	VI	5.194	3655404	G/A	MGG_00143.5
Y34-0178	325	252/253(100%) 72/72(100%)	-b	5.139	33793	T/T	MGG_14318.5

a.^a / ^bthe inserted position; b^b - "unknown chromosome number.

表 1 中列出了有效扩增得到的稻瘟菌侧翼序列的突变体 T-DNA 在基因组上的插入位置、可能影响的基因。这些突变体中, 有的与野生型无明显差别; 但有的菌落形态异常, 如 Y34-0211; 有的分生孢子细长, 如 Y34-0145(图 2); 有的分生孢子产生能力下降, 如 Y34-1001(数据未显示); 有的致病力下降。这些表型的变异, 极可能是由 T-DNA 插入, 破坏基因

的表达所致。因此, 这些突变体是后期研究稻瘟菌基因功能研究的宝贵材料。

2.3 T-DNA 边界剪切位点的分析结果

前人研究证明 T-DNA 插入多种植物时, 左边界都有不同程度的缺刻或截短, 而右边界的插入往往都在某一个特定位点^[14, 45]。在本研究 17 个有效获得稻瘟菌侧翼序列的供试菌株中, 共获得 10 条 T-

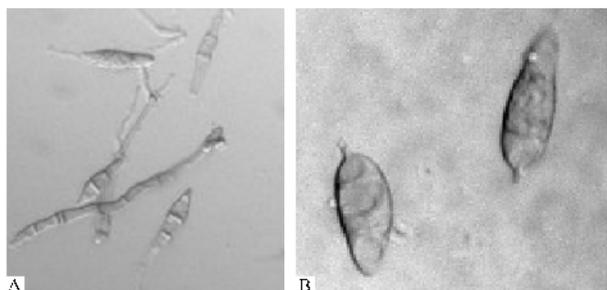


图2 稻瘟菌突变体 Y34-0145 (A) 与野生型菌株 Y34 (B) 的分生孢子形态

Fig.2 The conidium morphology of mutant Y34-0145 (A) and its wild type Y34 (B), *Magnaporthe grisea*.

表2 稻瘟菌转化子基因组 T-DNA 中边界剪切位点的分析

Table 2 The analysis of T-DNA nick positions in *Magnaporthe grisea* transformants

Nicking position of T-DNA border (5'→3')	T-DNA border	Transformant ID
CCCGCCTTCAGTTTAAACTATCAGTGTTTGA	R	Y34-0133, Y34-0173, Y34-3025, Y34-1001, Y34-0195, Y34-0145, Y34-0144, Y34-1252, Y34-0619
CCCGCCTTCAGTTTAAACTATCAGTGTTTGACA	R	Y34-0178
GTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTA	L	Y34-1469
GTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTAC	L	Y34-0211
GTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCAC	L	Y34-0121, Y34-0588
GTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATAT	L	Y34-1414
GTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATATA	L	Y34-0635, Y34-0528-2

R: right border; L: left border.

3 结论和讨论

农杆菌介导 T-DNA 进入真菌细胞内的整合机制较为复杂, Bundock 等^[6]在利用该方法转化酿酒酵母时,发现有 T-DNA 整合到宿主线粒体 DNA 上的现象。廖鸣娟等^[16]推测可能有载体主链序列插入而不是 T-DNA 本身插入引起的突变。潘初沂[△]研究发现高达 37.5% TAIL-PCR 产物测序结果是质粒 pCAMBIA1300 的序列,在同一突变体内可以同时扩增到载体和稻瘟菌的序列片段。沙优宝等^{△△}克隆测序了 361 个不同的水稻 TAIL-PCR 产物,其中有 147 个只包含有载体 pCAMBIA1301 序列。本研究 39 个测序成功的片段中,只有 19 个序列与稻瘟病菌基因组数据库的 70-15 菌株基因组高度同源,其余 20 个片段是载体序列。出现这种现象的原因,可能与 T-DNA 的整合机制有关。根据方卫国^[5]的报道, T-DNA 质粒可能不整合到染色体 DNA 上,而以环状或线性的形式独立存在于细胞内。本研究中出现克隆到的 20 个载体序列,是不是也以自身的某种形式独立存在于细胞内,有待进一步研究。

理论上完整的 T-DNA 整合应包括两端残留的边界序列:左边界 22nt 和右边界 3nt。在转化植物时,曾观察到 T-DNA 整合后两端出现缺失的现象。

DNA 右侧翼序列,其中 9 条剪切位点为:5'-CCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCCCTTCAGTTTAAACTATCAGTGTTTGA-3', 占总扩增得到右边界总数的 90%, 这与 T-DNA 插入位点的右侧翼具有共同剪切序列特征的观点相符。相对右侧翼序列而言,扩到的 7 条左侧翼序列的剪切位点规律性不强,具有不同的缺刻或截短(表 2)。

通常左边界由于缺乏保护常被全部或部分降解掉,右边界相对完整^[8-10]。本研究结果表明, T-DNA 在稻瘟病菌基因组的整合上有类似现象,说明 T-DNA 在真菌中可能和植物中的整合机制类似。

本研究结果表明,在 17 个插入突变株中, Y34-0121 与 Y34-0588、Y34-0635 与 Y34-0528-2、Y34-1001 与 Y34-3025 的突变位点完全相同。这可能说明了农杆菌 T-DNA 介导的遗传转化并不是完全随机的, T-DNA 在目标生物细胞的基因组上的某些位点具有插入偏好性。就稻瘟菌的遗传转化而言,到底哪些位点插入机会大,迄今为止还没有见其规律性的报道。

本研究用 TAIL-PCR 从 Y34-0635 突变株的基因组 DNA 上扩增到 3 个片段,这 3 个片段的前段序列相同。出现这种现象的原因,可能是因为 TAIL-PCR 过程中的高温循环,使简并引物有机会在插入位点的侧翼序列上多处退火。离插入位点近些的退火位置,扩增到的片段小些,其凝胶电泳得到的信号比较弱。反之亦然。因此,对于单拷贝插入的模板的 TAIL-PCR 扩增,在回收第三轮 TAIL-PCR 产物时,为了节省工作量,可以只要回收信号最强的条带。

尽管本研究所精细定位的 17 个突变菌株 T-

△潘初沂. 稻瘟病菌 T-DNA 插入致病突变体的分析. 福建农林大学 2004 届硕士学位论文.

△△沙优宝. 水稻 T-DNA 插入群体的建立和突变体的分析. 中国科学院微生物研究所 2003 届博士学位论文.

DNA 插入位点,大部分所对应的可能基因在稻瘟菌基因组数据库中已经有注解,但除了少数突变体(如 Y34-1469 的插入已经确定是稻瘟菌水解酶编码基因)以外,多数基因还缺乏功能鉴定方面的资料。其中一些突变体(如 Y34-0145)的插入位点附近尚未任何基因的报道,但其突变确实产生表型。因此,在这些突变位置精细定位的基础上,进一步克隆基因,为开展基因功能鉴定奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Valent B. Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology*, 1990, **80**(1): 33 – 36.
- [2] Xu JR, Xue CY. Time for a blast : genomics of *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant Pathology* 2002, **3**(3): 173 – 176.
- [3] Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, *et al.* The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 2005, **434**(7036): 980 – 986.
- [4] 张帆, 金维正, 陈双燕, 等. 质粒营救法和 TAIL-PCR 法获得水稻 T-DNA 侧翼序列的效率比较. *农业生物技术学报*, 2004, **12**(1): 13 – 18.
- [5] 方卫国, 张永军, 杨星勇, 等. 根癌农杆菌介导真菌遗传转化的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2002, **22**(5): 41 – 44.
- [6] Bundock P, Den DR, Beijersbergen A, *et al.* Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO*, 1995, **14**(13): 3206-3214.
- [7] Tzfira T, Li J, Lacroix B, *et al.* *Agrobacterium* T-DNA integration : molecules and models. *Trends Genet* 2004, **20**(8): 375 – 383.
- [8] Brunaud V, Balzergue S, Dubreucq B, *et al.* T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Rep* 2002, **3**(12): 1152 – 1157.
- [9] Forsbach A, Schubert D, Lechtenberg B, *et al.* A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Mol Biol* 2003, **52**(1): 161 – 176.
- [10] Kim SR, Lee J, Jun SH, *et al.* Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol Biol* 2003, **52**(4): 761 – 773.
- [11] Talbot NJ, Salch YP, Ma M, *et al.* Karyotypic variation within clonal lineages of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(2): 585 – 593.
- [12] 贺春萍, 林春花, 廖奇亨. 稻瘟病菌 T-DNA 插入突变体库构建及致病相关突变体筛选. *热带作物学报*, 2007, **28**(1): 80 – 84.
- [13] Mullins ED, Chen PX, Romaine P, *et al.* *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* 2001, **91**(2): 173 – 180.
- [14] Tinland B. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci*, 1996, **1**(6): 178 – 184.
- [15] Hiei Y, Ohta S, Komari T, *et al.* Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant*, 1994, **1**(2): 271 – 282.
- [16] 廖鸣娟, 董爱华, 王正栋, 等. 植物转座子及其在功能基因组学中的应用. *遗传*, 2000, **22**(5): 345 – 348.

Spotting the positions of T-DNA on the genome for *Magnaporthe grisea* transformants and study on the mode of T-DNA insertion

LIN Chun-hua², HE Chun-ping¹, WANG Kui-di², LIAO Qi-heng², ZHENG Fu-cong^{1,2*}

(¹ Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

(² Environment and Plant Protection College, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract : Using thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR), 39 specific fragments of *Magnaporthe grisea* genomic DNA flanked on the T-DNA were successfully amplified from 37 *M. grisea* transformants randomly selected from the mutants induced by T-DNA insertion in our laboratory. These fragments were sequenced and then compared by BLAST with the sequences of *M. grisea* genomic DNA published in network. T-DNA insertion positions for 17 transformants were spotted on the genome of *M. grisea*. Of all the 39 amplified specific fragments, 19 were *M. grisea* genomic DNA and 20 contained the vector backbone sequences. Of the 19 *M. grisea* genomic DNA fragments, 10 flanked on the right and 9 on the left border of T-DNA inserted. Of the 10 *M. grisea* genomic DNA fragments flanked on the right border of T-DNA, 9 had a 102bp identical sequence. However, the 7 fragments flanked on the left border of T-DNA did not have this regularity. The above results demonstrated that T-DNA right nick positions were relatively fixed on the *M. grisea* genomic DNA, similar to the ones on plant genomic DNA. The spotted positions of T-DNA on the genome for 17 *M. grisea* transformants established a solid foundation for further functional genomic research of *M. grisea*.

Keywords : *Magnaporthe grisea* ; T-DNA ; TAIL-PCR ; sequence analysis

Foundation item : Chinese National Natural Sciences Fund (30260046)

* Corresponding author. Tel : 86-898-23300371 ; E-mail : zhengfucong@126.com

Received : 14 November 2006 / Accepted : 31 December 2006 / Revised : 21 March 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>