

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(2):169-173; 4 February 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 农杆菌介导的灰葡萄孢 T-DNA 插入突变体库构建及插入位点分析

冯娟, 朱廷恒\*, 崔志峰, 汪琨

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310014)

**摘要:**【目的】利用农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导法对灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 进行转化, 构建 T-DNA 插入突变体库, 为从分子水平上认识灰葡萄孢的致病机制打下基础。【方法】以含有 pCambia1390 二元载体的农杆菌对灰葡萄孢进行转化, 利用潮霉素进行筛选。对抗性稳定的转化子进行生物学和形态学观察, 采用离体番茄叶片进行致病性测定。利用 TAIL-PCR 技术对突变体中 T-DNA 的旁侧序列进行克隆。【结果】得到了一些突变体, 表现为生长速率减缓、产孢能力下降、致病力减弱等。克隆并分析了其中一个突变体中 T-DNA 插入的位置和旁侧序列。【结论】本实验建立了农杆菌介导的灰葡萄孢转化体系, 构建了 T-DNA 插入的灰葡萄孢突变体库。用 TAIL-PCR 进行突变体中 T-DNA 旁侧序列的分析是可行的。

**关键词:** 灰葡萄孢; 农杆菌介导; T-DNA; TAIL-PCR

**中图分类号:** Q933      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0169-05

灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 属于半知菌亚门, 丝孢纲, 丝孢目, 淡色孢科葡萄孢属, 是寄主范围广泛、危害十分严重的一种植物病原真菌。引起 200 多种植物的灰霉病菌, 包括番茄、黄瓜、葡萄等重要的蔬菜和水果作物<sup>[1]</sup>。由于病菌主要为害果实和花, 造成较严重的经济损失。以番茄为例, 灰葡萄孢引起的番茄灰霉病是危害番茄生产的主要病害之一, 严重时可造成 20% - 30% 的减产<sup>[2]</sup>。

灰葡萄孢是典型的死体营养型的非专性寄生病原真菌, 一般认为该菌的主要致病因子包括产生胞壁降解酶和产生毒素等, 杀死并利用植物细胞为营养<sup>[3]</sup>。但是, 目前对于灰葡萄孢致病的分子机理还不清楚。另外, 由于目前灰霉病主要以化学防治为主, 这样导致了灰葡萄孢已经对多种不同作用机制的杀菌剂产生了抗药性<sup>[4-6]</sup>。因此, 广泛的寄主和

迅速产生的抗药性使得当前灰霉病的防治十分困难, 短期内很难找到有效的防治措施。长远来看, 及早开展查找灰葡萄孢的致病因子、探究致病分子机制、分析和寄主植物免疫途径的互动机制等方面的基础研究, 可以为更有效的综合防治策略提供科学依据。

利用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导的 T-DNA 转化技术来研究植物病原真菌的致病功能基因是一种重要的技术手段, 在稻瘟菌 (*Magnaporthe grisea*)<sup>[7]</sup> 等多种真菌上已广泛应用, 但在灰葡萄孢研究中的应用才刚刚开始。我们建立了农杆菌介导的灰葡萄孢转化体系, 构建了 T-DNA 插入突变体库, 筛选到了多种表型的突变体, 并进行了初步的分析, 为以后的研究建立了基础。

**基金项目:** 浙江省钱江人才计划 (2009R10030); 浙江省人事厅留学回国人员择优资助项目; 浙江省自然科学基金资助项目 (Y307492)

\* 通信作者。Tel: +86-571-88320741; E-mail: thzhu@zjut.edu.cn

**作者简介:** 冯娟 (1984 -), 女, 浙江台州人, 硕士研究生, 从事分子微生物学研究。

**收稿日期:** 2009-09-20; **修回日期:** 2009-11-06

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒:**灰葡萄孢单倍体菌株 B05.10 由德国 P. Tudzynski 教授 (Westfälische Wilhelms-University) 惠赠。农杆菌菌株 AGL1 由浙江省农科院张震博士惠赠。质粒 pCAMBIA1390 由澳大利亚国际农业分子生物学应用中心惠赠。

**1.1.2 培养基:**马铃薯蔗糖培养基 (PSA), 用于灰葡萄孢培养。LB 培养基用于细菌培养。MM 培养基: 葡萄糖 1.8 g, 甘油 5 mL,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.066 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.66 g,  $\text{MgSO}_4$  0.492 g, 2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (pH 5.3) 8.528 g, NaCl 0.1461 g,  $\text{CaCl}_2$  0.045 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0025 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.528 g, 加去离子水至 1 L。IM 液体培养基 (1 L): MM 培养基加入乙酰丁香丙酮达到终浓度 200  $\mu\text{mol/L}$ 。SM 培养基: 下层为 IM 固体培养基共培养; 上层为: 麦芽提取物 2%, 琼脂 1.5%, 头孢噻肟钠 (终浓度 100  $\mu\text{g/mL}$ ), 潮霉素 B (终浓度 100  $\mu\text{g/mL}$ )。

**1.1.3 试剂和其他:**乙酰丁香丙酮、卡那霉素、利福平、氨基青霉素、头孢噻肟钠等试剂购自上海生工, 各种限制性内切酶、连接酶、T-载体 pMD18-T、Taq DNA 聚合酶等购自 TAKARA 公司 (大连), 潮霉素 B 购自 Sigma 公司, 质粒提取试剂盒购自博大泰克公司。引物均由由上海生工合成。序列测定交华大基因公司完成。

### 1.2 带双元载体的农杆菌构建及其介导的灰葡萄孢转化

将 100  $\mu\text{L}$  根癌农杆菌 AGL1 感受态细胞与 50 ng 载体 pCMBIA1390 混合, 依次置于冰上 30 s, 液氮速冻 5 min, 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴 3 min, 加入 LB 液体培养基后在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养 2 h, 涂布于 LB 固体培养基 (含卡那霉素 100  $\mu\text{g/mL}$ , 利福平 100  $\mu\text{g/mL}$ ), 28 $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后挑转化子进行鉴定。

测定潮霉素对灰葡萄孢菌株 B05.10 对的抑制浓度, 在设置系列含潮霉素浓度 (20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) 的平板上进行测定。

把灰葡萄孢接种到 PSA 培养基上, 23 $^{\circ}\text{C}$  培养 5-6 d, 用无菌水将新鲜的分生孢子洗下, 显微镜下计数, 使其浓度达到  $10^6$  个/mL。将带有质粒 pCAMBIA1390 的农杆菌接进 5 mL 的 LB 液体培养基 (含卡那霉素 100  $\mu\text{g/mL}$ , 利福平 100  $\mu\text{g/mL}$ ), 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养过夜。稀释使其  $OD_{600}$  达到

0.15 后取 2 mL 农杆菌液体接进 2 mL IM 液体诱导培养基, 同时加入乙酰丁香丙酮 (终浓度 200  $\mu\text{mol/L}$ ), 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 继续培养至  $OD_{600}$  达到 0.4-0.5。将农杆菌和灰葡萄孢孢子按个数比例为 10:1 混合, 涂布于 IM 平板培养 48 h 后, 覆盖 SM 培养基并在 23 $^{\circ}\text{C}$  继续培养, 观察转化子出现。

### 1.3 灰葡萄孢遗传稳定性转化子筛选及表型观察

从 SM 培养基上选择出现的转化子菌落, 转接到含有潮霉素 (100  $\mu\text{g/mL}$ ) 的 PSA 培养基上继代培养, 待长出孢子后, 进行单孢子分离继代培养, 在含潮霉素的培养基上继代 5 次, 获得稳定遗传的转化子后分别进行试管斜面低温保藏和超低温冰箱冻存, 备用。

将灰葡萄孢转化子在含潮霉素的平板活化培养, 用打孔器制取菌碟 (直径 1 cm), 然后转接到新鲜的平板上进行培养并观察形态特征、生长速率、产孢情况、颜色等性状的变化。菌碟接种到离体番茄叶面进行致病性测定。野生型菌株为对照。

### 1.4 灰葡萄孢基因组提取及潮霉素基因 PCR 鉴定

灰葡萄孢菌株培养在 23 $^{\circ}\text{C}$  下、PSA 固体培养基上活化培养后收集菌丝, 将其转入 PSA 液体培养基中 26 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养, 等菌液出现丰富的菌丝体时, 过虑收集菌丝体, 用 DNA E. Z. N. A.® Fungal DNA Kit (Omega Bio-Tek, USA) 提取基因组 DNA。利用 PCR 技术检测插入的潮霉素基因, 潮霉素基因引物对为: hptF: 5'-TTTCATGTAGCAGGGCGTGA-3'/hptR: 5'-CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG-3'。

### 1.5 突变体插入位点侧翼序列的克隆和测序

利用改进的 TAIL-PCR 技术扩增突变体 T-DNA 插入位点的侧翼序列<sup>[8]</sup>。根据质粒 pCAMBIA1390 的 T-DNA 区域序列设计嵌套特异引物, 左边界 3 条引物分别为 LSP1, 5'-GCCGACCGGATCTGTCCATCGA-3'; LSP2, 5'-CGCTCATGTGTTGAGCATATA-3'; LSP3: 5'-CGGCGTTAATTCAGTACATTA-3'。右边界 3 条引物分别为 RSP1, 5'-GGGTTTTATGAT TAGAGTCCCG-3'; RSP2, 5'-CGCGCGCGGTGTCAT CTATGT-3'; RSP3, 5'-GGATATATTGGCGGTTAAAC-3'。简并引物为 LAD1-1, LAD1-2, LAD1-3, LAD1-4, LAD1-5 和 AC1, 序列参照文献<sup>[8]</sup>。

TAIL-PCR 基本程序和参数参照文献进行<sup>[8]</sup>, 略有改进。共 3 轮 PCR, 第一轮反应中加入 100 ng 的基因组 DNA 作为模板。第一轮扩增的产物稀释 50 倍, 取 5  $\mu\text{L}$  作为第二轮反应的模板。第二轮反应的产物进行一定倍数的稀释后 (5 倍到 200 倍之间试验), 取 5  $\mu\text{L}$  做模板进行第三轮扩增, 产物经

凝胶电泳并回收后与 T 载体连接,转化大肠杆菌,进行蓝白筛选,提取质粒进行序列测定。

## 1.6 扩增产物序列分析

用 DNASTar 软件进行序列分析。在灰葡萄孢基因组数据库 ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/botrytis\\_cinerea](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/botrytis_cinerea)) 中进行 BLAST 搜索,分析突变体中 T-DNA 的插入位点。在 GenBank 利用 BLAST 进行同源性搜索。

## 2 实验结果和分析

### 2.1 农杆菌介导的灰葡萄孢转化以及突变体表型分析

经过测定发现,潮霉素浓度为 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时就

可以抑制野生型灰葡萄孢 B05.10 菌株的生长。利用带有二元载体 pCAMBIA1390 的农杆菌对灰葡萄孢进行了转化,选择浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的潮霉素进行转化子筛选。获得了一些抗潮霉素的稳定遗传的转化子,不同批次的转化中,转化率约为 20 - 100 转化子/ $10^6$  个孢子。对这些转化子从形态特征、生长发育和致病性等方面进行了表型的初步鉴定。比较明显的表型包括生长菌丝稀疏、生长速率缓慢、不产孢或产孢量减少、致病性减弱或丧失等。部分突变体如图所示(图 1)。其中 20 号转化子(图 1-D)与野生型相比,菌落生长速率明显降低,培养 7 天后菌落直径只有 4 cm 左右,不产孢。我们选择该转化子进行进一步研究。

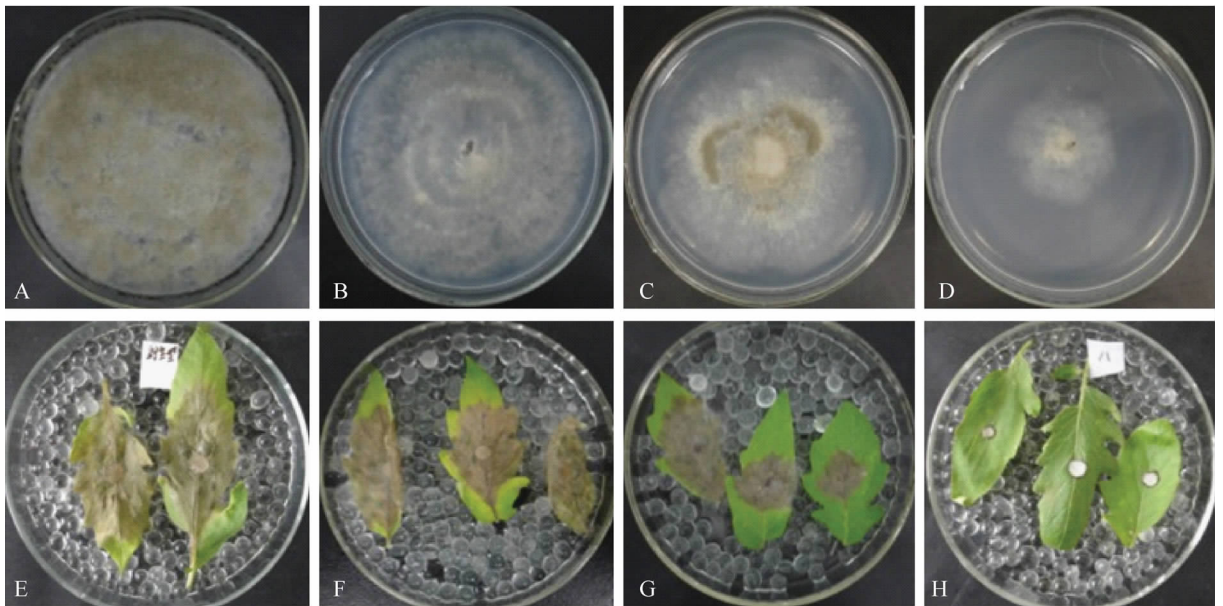


图 1 灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 的 T-DNA 插入突变体表型。图中,菌株的生长和产孢等性状是在培养 7 d 后观察的结果。致病性表现为接种后 4 d 的观察结果。

Fig. 1 Phenotypes of T-DNA insertion mutants of *Botrytis cinerea*. The biological characters of *B. cinerea* including growth, development and conidiation were observed after 7 d culture. The pathogenicity was measured 4 d after inoculation. A, Wild type; B, Sparse hyphae and significantly reduced conidiation; C, Reduced growth rate and conidiation; D, Significantly reduced hyphal growth rate. Pathogenicity of *B. cinerea* on the tomato leaves was showed from E to H. E, Wild type; F, Reduction in pathogenicity; G, Reduction in pathogenicity and delay in disease progression; H, Loss of pathogenicity.

### 2.2 突变体分子鉴定

通过对获得的突变体进行生物学性状和致病性测定的考察后,对几个性状有明显改变的突变体进行了分子鉴定。本文首先报道对突变体 20 号(图 1-D)的初步研究。首先利用潮霉素基因特异的引物通过 PCR 扩增出了相应的条带(图 2-A),说明该转化子是由于 T-DNA 插入突变引起。然后,利用嵌套的 T-DNA 区的特异序列和随机引物通过 TAIL-PCR 技术对 T-DNA 插入区的旁侧序列进行了扩增。

其中 T-DNA 左边界的特异引物和简并引物扩增出了一条约 450 bp 左右的片段(图 2-B),经 T-A 克隆和测序后结果表明该序列中含有完整的 T-DNA 左边界序列以及紧邻的灰葡萄孢基因组序列(图 3)。旁侧序列在灰葡萄孢基因组数据库中 BLAST 后,只发现一个位置有相似序列,该位置处 T-DNA 插入位点是 Supercontig 1 的 228981 位。该位置处预测的基因经 GenBank 上 BLAST 搜索后未发现功能已知的同源物。

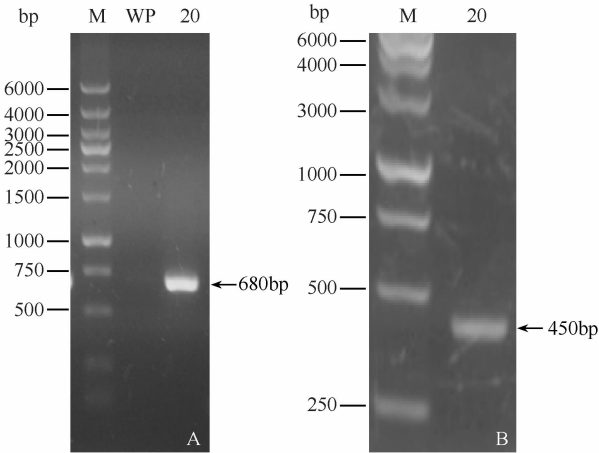


图 2 20 号突变体的分子鉴定

Fig. 2 Molecular characterization of mutant No. 20. A: PCR amplification of hygromycin gene from genomic DNA of *Botrytis cinerea* mutant No. 20; B: TAIL-PCR amplification of flanking sequence of the T-DNA region inserted in the *B. cinerea* genome.

```

TGACGAAGCTGCAGTCGACGATTCGGCGTTATTTCAGTACATTAAAAAACGT
CCGCAGTGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATA
TATCCTGCCATCTCGATTAGGGAAGGAAATCGTGATAGACGAAAGAGCCATC
ATGATCAGATTGTAAAACTCGATCCAAGTGGACGAGATGAAAAGAAGAGGTGGT
GTGCAGCGTTCTCCACTCACTTCTGTTCCCCTCAGTACTACACGAACTACGT
AGATGTACCATAACAAGGAAACGTCATATCGTAGTATCTGGCACCCAAGCACCCG
AGTATGATATGGCTGAAGATAAATGTCTTAGTACTCTCTCAAACGATAAGACTC
CTTATCTACTGGCTCTACATGTAACCAAACAACAGCCATGAGTAACCAACGTAA
TCGTTATCTCACTCGTCTAATCTCTAGAGGATCCCC

```

图 3 T-DNA 区域在灰葡萄孢基因组中的插入点及其旁侧序列

Fig. 3 Insertion site of T-DNA and its flanking sequence in the *Botrytis cinerea* genome. The underlined is LSP3 primer sequence. The boxed indicates the T-DNA left border. The italic part is the T-DNA flanking sequence in *B. cinerea* genome.

致,说明 CaMV35S 在某些丝状真菌中也能用作驱动外源选择标记基因的表达,这样可以免除对许多植物来源的双元载体的改造等繁琐工作。

通常,农杆菌介导的丝状真菌的转化中,农杆菌和受体孢子是在硝酸纤维素膜等介质上进行共培养,共培养之后将膜剪成细条移至选择性培养基。本实验中,我们采用直接在平板上共培养后覆盖选择性顶层培养基,这样可以简化步骤,对大规模构建突变体库可以提高效率。

利用 TAIL-PCR 对转化子进行 T-DNA 旁侧序列的克隆过程中,我们对特异性引物和随机简并引物的多对组合进行了探索,但结果发现只有少数组合能够得到理想的扩增结果,即经过 3 轮扩增后有一条带。因此,本研究表明,在利用 TAIL-PCR 进行研究中,要对其中的参数进行大量的优化试验。另外,本研究中得到的 20 号突变体中 T-DNA 的旁侧序列

### 3 讨论

我们建立了农杆菌介导的灰葡萄孢遗传转化方法,初步构建了灰葡萄孢的 T-DNA 插入突变体库。经过筛选后,获得了一些表型明显改变的突变体。其中突变体 20 号表现出菌落生长明显减缓,不产孢。进一步用 TAIL-PCR 的方法克隆出了该突变体中 T-DNA 插入点的旁侧序列。

在本实验的转化中,我们选择了植物双元载体 pCAMBIA1390 进行灰葡萄孢的遗传转化。该载体中的选择标记潮霉素抗性基因的启动子为花椰菜病毒 (CaMV) 35S。本研究表明,该启动子驱动的潮霉素基因在灰葡萄孢中能够表达,转化子可以耐受浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的潮霉素。这与对尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)<sup>[9]</sup> 及我们之前报道的水稻赤霉菌 (*Gibberella fujikuroi*)<sup>[10]</sup> 的转化中的研究结果一

致,说明 CaMV35S 在某些丝状真菌中也能用作驱动外源选择标记基因的表达,这样可以免除对许多植物来源的双元载体的改造等繁琐工作。

### 参考文献

- [1] Jarvis, WR. Taxonomy and Epidemiology, in The biology of *botrytis*, eds by Coley-Smith, JR, Verhoeff, K. and Jarvis, WR London: Academic Press, 1980, pp219-250.
- [2] 张从宁,高智谋,岳永德. 番茄灰霉病研究进展有害生物综合治理策略与展望. 北京:中国农业科技出版社 (*Science and Technology of China Agricultural*), 2002, 80-82.
- [3] Choquer M, Fournier E, Kunz C, et al. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 277:1-10.

- [ 4 ] Hayashi K, Schoonbeek H, Sugiura H, et al. Multidrug resistance in *Botrytis cinerea* associated with decreased accumulation of the azole fungicide oxpoconazole and increased transcription of the ABC transporter gene *BeatrD*. *Pestic Biochem Physiol*, 2001, 70:168-179.
- [ 5 ] 丁中, 刘峰, 慕立义. 不同抗性型灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 对不同作用机制杀菌剂的敏感性研究. 农药学报 (*Chinese Journal of Pesticide Science*), 2001, 3: 59-63.
- [ 6 ] 韩巨才, 刘慧平, 闫秀琴 等. 灰霉病菌对三种杀菌剂的抗性表现型分布及稳定性测定. 农药学报 (*Chinese Journal of Pesticide Science*), 2004, 6:43-47.
- [ 7 ] Balhadère PV, Foster AJ, Talbot NJ, Identification of pathogenicity mutants of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1999, 2: 129-142.
- [ 8 ] Liu YG, and Chen YL. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *BioTechniques* 2007, 43:649-656.
- [ 9 ] Mullins ED, Chen X, Romaine P, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 2001, 91:173-80.
- [ 10 ] Zhu TH, Wang WX, Yang X, et al. Construction of two Gateway fungal expression vectors. *Plasmid*, 2009, 62: 128-133.

## Construction of T-DNA insertion mutants of *Botrytis cinerea* via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and sequence analysis of insertion site

Juan Feng, Tingheng Zhu\*, Zhifeng Cui, Kun Wang

(College of Biological & Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] Construction of *Botrytis cinerea* T-DNA insertion mutant library through *Agrobacterium*-mediated transformation and for further understanding of the molecular mechanisms underlying the pathogenicity of *Botrytis cinerea*. [ **Methods** ] *Agrobacterium* containing the binary vector pCMBIA1390 was used for transformation of *Botrytis cinerea*. Hygromycin resistant transformants were screened out and subjected to biological and morphological observation. Detached tomato leaves were used for pathogenicity assay. The flanking sequence of T-DNA inserted in mutant genome was cloned and analyzed by using TAIL-PCR. [ **Results** ] A variety of mutants were obtained and important phenotypes including reduction in growth rate, loss or reduction in conidiation and loss of pathogenicity were screened out. The T-DNA flanking sequence of one of the mutants was successfully amplified with TAIL-PCR. [ **Conclusion** ] *Agrobacterium*-mediated transformation system of *Botrytis cinerea* was established and a T-DNA insertion mutants library was constructed. TAIL-PCR was an effective method for isolating the flanking sequence of T-DNA inserted in genome.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*; *Agrobacterium tumefaciens*; T-DNA; TAIL-PCR

(本文责编: 张晓丽)