

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(2):270-275; 4 February 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

农杆菌介导转化黑曲霉分生孢子及产孢缺陷突变子 T-DNA 插入位点分析

黄文, 杨洪江*, 秦慧彬

工业微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

摘要:【目的】利用农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) T-DNA 系统, 建立转化黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 分生孢子的方法, 构建 T-DNA 插入突变子文库, 为黑曲霉基因组功能注释研究打下基础。【方法】采用携带二元质粒载体 pCAMBIA1301 的农杆菌 EHA105, 诱导转化黑曲霉分生孢子, 筛选具有潮霉素抗性的突变子。分析抗性稳定突变子菌株的表型, 采用反向 PCR 方法分析 T-DNA 插入位点相邻位置的序列, 并推测突变基因可能具有的功能。【结果】实验获得具有稳定潮霉素抗性转化子 193 株, 转化率为 5.6×10^2 转化子/ 10^8 分生孢子。部分转化子表型出现较为明显改变, 其中一株不能产孢, 对其 T-DNA 插入位点序列分析比对结果显示, 突变基因属于超级转运家族 (major facilitator superfamily, MFS)。【结论】本研究建立的农杆菌转化黑曲霉分生孢子平台, 结合 T-DNA 插入突变位点分析, 可以为黑曲霉基因组功能注释研究提供一种简便有效的途径。

关键词: 黑曲霉分生孢子, 农杆菌介导转化, T-DNA, 反向 PCR

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 02-0270-06

生物技术产业中, 黑曲霉广泛用于食品、药物和工业酶制剂的生产, 同时还是表达外源蛋白的细胞工厂, 具有重要的应用价值^[1]。黑曲霉基因组测序已经完成, 整个基因组包括大约 3400 万个碱基。其基因组注释结果表明, 14165 个读码框中有 6506 个读码框能够预测功能, 只占总数的 45.9%, 大部分基因功能还属于未知^[2]。对黑曲霉基因组的进一步注释, 不仅需要生物信息学领域有所突破, 更需要从分子生物学等多个方面展开实验, 进行黑曲霉功能基因组学的研究。其中建立高效的黑曲霉转化体系, 是构建相应的黑曲霉插入突变子文库, 开展功能基因组学研究的关键^[3]。

丝状真菌转化方法较多, 包括 CaCl_2 -PEG 介导

转化、醋酸锂处理、基因枪和电击等方法^[4], 这些方法分别具有不同的优势与缺点^[5]。1998 年, 农杆菌介导转化的方法应用于丝状真菌的基因操作^[6]。目前, 农杆菌已经成功转化了 60 多种真菌, 如泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)、粗糙脉胞菌 (*Neurospora crassa*)、稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 和瓜类炭疽 (*Colletotrichum lagenarium*) 等^[3]。

在农杆菌介导的丝状真菌转化中, 原生质体、分生孢子和萌发分生孢子均可作为出发材料, 但是转化效率存在较大区别。如泡盛曲霉分生孢子转化, 转化效率可达 $2-2.5 \times 10^4$ 转化子/ 10^8 分生孢子^[8], 而农杆菌介导转化黑曲霉分生孢子, 转化率仅为

基金项目: 天津市自然科学基金 (08JCYBJC26600); 天津科技大学启动基金 (20070436)

* 通信作者。Tel: +86-22-60601396; E-mail: hongjiangyang@tust.edu.cn

作者简介: 黄文 (1984-), 女, 黑龙江省尚志市人, 硕士研究生, 从事环境微生物研究。E-mail: huangwen@mail.tust.cn

收稿日期: 2010-08-02; **修回日期:** 2010-09-08

5×10^8 转化子/ 10^8 分生孢子^[6]。为提高转化效率,构建 T-DNA 插入突变子文库,本研究拟采用不同黑曲霉与农杆菌菌株,建立和优化农杆菌转化黑曲霉分生孢子方法,结合 T-DNA 插入突变位点分析,可以为黑曲霉基因组功能注释研究提供一种简便有效的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒:黑曲霉野生型菌株编号为 AS3.316,由中科院北微所保藏,农杆菌 EHA105、大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 和质粒 pCAMBIA1301 均由本实验室保存。

1.1.2 培养基:察氏培养基用于黑曲霉液体培养^[7];察氏培养基添加 200 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮用于农杆菌诱导转化黑曲霉实验^[8];察氏培养基添加 100 mg/L 潮霉素和 50 mg/L 硫酸庆大霉素用于黑曲霉转化子筛选^[8];麦麸斜面培养基用于黑曲霉菌株生孢与保藏^[10];诱导培养基(induction medium, IM)用于农杆菌转化黑曲霉^[7];LB 培养基用于农杆菌和大肠杆菌培养^[10]。

1.2 农杆菌介导转化黑曲霉分生孢子

28 $^{\circ}\text{C}$ 培养农杆菌 EHA105 至 OD_{600} 为 0.8 左右,离心收集菌体制备电击感受态细胞。将质粒 pCAMBIA1301 与感受态细胞混合后,连续电击 5 次^[11-12],每次间隔 15 s,在含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上筛选转化子。

挑取单个转化子接种于 5 mL LB 液体培养基中(含 20 mg/L 利福平,50 mg/L 卡那霉素),28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16-18 h。离心去上清收集菌体,沉淀用 1 mL 的 IM 培养基重悬,再次离心收集菌体,沉淀悬于 20 mL 含 200 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮的 IM 培养基中,23 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 $OD_{600} \approx 0.5$,离心收集菌体,重悬于 500 μL IM 培养基中备用。

利用麦麸斜面培养基培养黑曲霉,生孢后用生理盐水制备黑曲霉孢子悬液,经 4 层无菌纱布过滤除菌丝,离心去上清后重悬于生理盐水中,显微镜观察计数,调整孢子浓度为 10^7 个/mL。

混合 500 μL 孢子悬液与 500 μL 农杆菌悬液,置于 IM 诱导固体培养基上,23 $^{\circ}\text{C}$ 避光诱导 48 h 后,刮取黑曲霉孢子和农杆菌混合物,悬于 25 mL 生理盐水中,离心将沉淀重悬于 1 mL 生理盐水中,涂布

在含有潮霉素与硫酸庆大霉素的选择培养基上,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5-7 天,即有转化子长出。转化子转接于含相同浓度潮霉素筛选培养基上,能够生长的转化子为阳性转化子。

1.3 黑曲霉转化子的 PCR 鉴定

设计引物 HPH-1 与 HPH-2,扩增潮霉素抗性基因,同时选择 18S rRNA 基因作为阳性对照(引物序列见表 1)。采用 Promega 公司试剂盒,分别提取黑曲霉野生型与转化子基因组 DNA 作为模板。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,运行 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再保温 10 min。

表 1 引物

Table 1 The Primers used in this study

Primer	Sequence(5'→3')	Source or reference
HPH-1	GATGTTGGCGACCTCGTATT	This study
HPH-2	GAAAAAGCCTGAACCTCACCG	This study
NS-1	GTAGTCATATGCTGTCTC	reference [13]
NS-4	CTTCCGTCAATTCCCTTAAG	reference [13]
IP-1	GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGG	This study
IP-2	ATCATCGCAAGACCGCAACAGGATT	This study

1.4 T-DNA 插入位点的序列分析

图 1 为分析 T-DNA 插入位点序列的技术路线示意图。首先根据文献报道的方法^[14],利用限制性内切酶 *Taq* I 酶切转化子基因组 DNA,然后用苯酚/氯仿/异戊醇抽提纯化酶切产物,取酶切产物加入 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 24 h,使 DNA 片段发生自身环化反应。然后连接产物作为模板,进行 PCR 扩增,所用引物序列 IP-1 与 IP-2 见表 1。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,然后进行 33 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min,完成上述循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。电泳回收纯化 PCR 产物,纯化的 PCR 产物与 Promega 公司提供的 pGEM-Teasy 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 。酶切鉴定转化子,挑选 2-3 个阳性克隆进行测序,正确的序列应该包括上下游引物、二元载体 pCAMBIA1301 相对应的部分序列和 1 个 *Taq* I 内切酶位点。获得序列存入 GenBank 数据库,接受号为 HQ003818。

2 结果

2.1 转化体系的建立

按照材料和方法中所述,将二元载体质粒 pCAMBIA

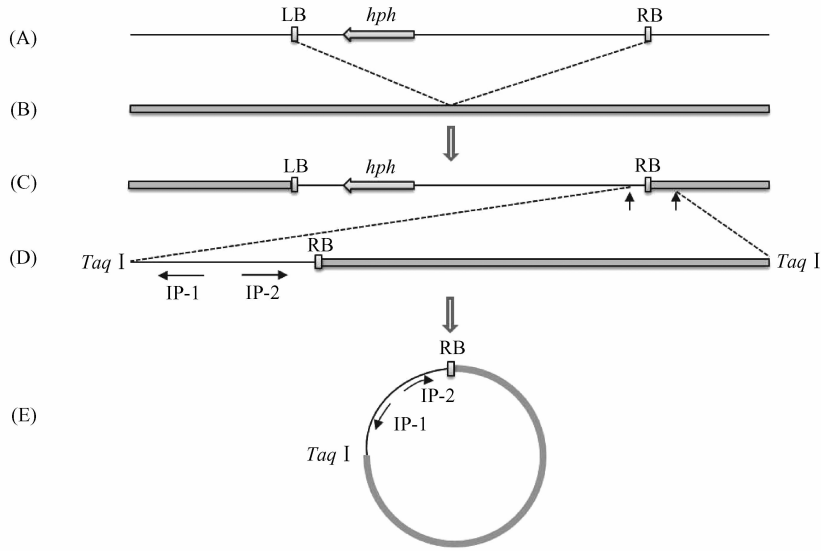


图 1 转化子染色体上 T-DNA 插入位点序列分析示意图

Fig. 1 Scheme of T-DNA insertion site sequence analysis of transformant chromosome DNA. A: T-DNA on the binary plasmid pCambia1301; B: genomic DNA of *Aspergillus niger*; C: T-DNA integrated genomic DNA of transformant; D: DNA fragment containing partial sequences of both T-DNA and genomic DNA generated by the digestion of restriction enzyme *Taq*I; E: The digested DNA fragment was cyclized by T4 DNA ligase and it was amplified with the primers IP-1 and IP-2; LB: left border of T-DNA; RB: right border sequence of T-DNA; *hph*: hygromycin phosphotransferase gene; IP-1 and IP-2: primers for inverse PCR; *Taq*I: restriction enzyme. Arrows: indicating of *Taq*I restriction sites.

1301 电击转化进入农杆菌 EHA105 中, 获得菌株用于转化黑曲霉。转化过程中, 选择不同的转化对象, 包括菌丝体部分酶解制备的原生质体、分生孢子部分酶解制备的原生质体、处于不同萌发阶段的分生孢子和分生孢子等不同出发材料。实验结果显示, 前 3 种材料不能产生转化子; 而直接以分生孢子为材料, 可以获得转化子。在筛选培养基上, 培养 5-7 天能够发现黑曲霉转化子单菌落的形成。为了抑制农杆菌的生长, 在培养基中加入了庆大霉素。

转化子经在筛选培养基上划线复筛确认, 转接

到麦麸斜面培养基上, 连续传代十次后, 重新在含有潮霉素的筛选培养基上划线培养, 测定转化子的遗传稳定性。利用这一转化体系, 共获得 193 个稳定的黑曲霉转化子, 转化效率为 5.6×10^2 转化子/ 10^8 分生孢子。

2.2 产孢缺陷突变子的鉴定

与野生型菌株相比, 部分黑曲霉转化子表型变化较为明显, 如生长缓慢和产孢量较少。图 2 所示为一株转化子在麦麸培养基上的生长状况, 白色为菌丝体, 黑色为分生孢子。该菌株生长缓慢形成菌落较小, 培养 30 天后仍然没有分生孢子产生。

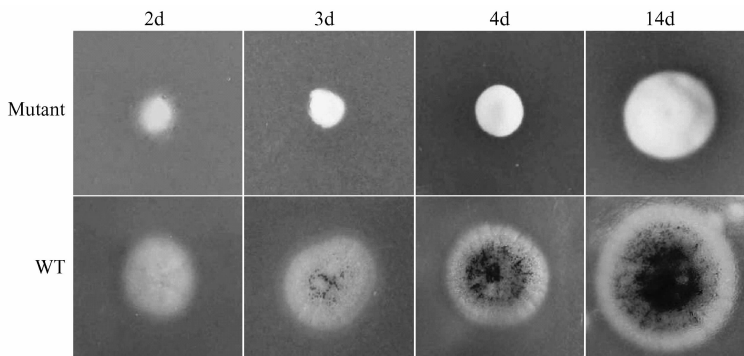


图 2 黑曲霉野生型菌株与产孢突变子的菌落形态

Fig. 2 Colony morphologies of *Aspergillus niger* wild type strain and the conidiation-defective mutant. WT: wild type. d: days (incubation time).

T-DNA 携带潮霉素基因 *hph*, 随机插入黑曲霉染色体不同位置。采用 PCR 方法扩增潮霉素基因片段, 验证产孢缺陷突变子的正确性。结果如图 3 所示, 以产孢缺陷突变子染色体为模板, 潮霉素基因扩增结果为阳性, 表明 T-DNA 已整合到黑曲霉基因组中; 而对照野生型黑曲霉菌株, 其扩增结果为阴性。18S rRNA 基因被选择为内对照, 扩增结果均为阳性。

2.3 T-DNA 插入位点序列的分析比对

按照图 1 所示的技术路线, 分析产孢缺陷突变子 T-DNA 插入位点的序列。反向 PCR 产物全长为 716 bp, 去除 T-DNA 序列部分, 黑曲霉染色体 DNA 片段长度为 558 bp, 见图 4。

在 NCBI 上检索核酸数据库没有发现同源序列, 而检索蛋白数据库则发现与一系列转运蛋白存在一定的同源性, 这些蛋白均属于超级转运家族 MFS。

另外, 黑曲霉基因组中只发现 2 个功能未知的

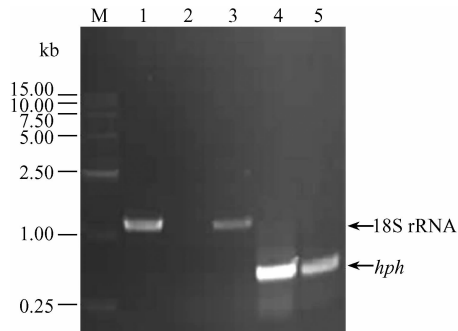


图 3 PCR 方法扩增潮霉素基因验证产孢缺陷突变子

Fig. 3 Identification of the conidiation-defective mutant by amplification of *hph* gene with PCR method. M: DNA molecular standard. Lane 1: amplification of 18S rRNA gene of wild type strain. Lane 2: amplification of *hph* gene of wild type strain. Lane 3: amplification of 18S rRNA gene of the conidiation-defective mutant. Lane 4: amplification of *hph* gene of the conidiation-defective mutant. Lane 6: amplification of the positive control with *hph* gene on the plasmid pCAMBIA1301.

GCGCGGTGCATCTATGTTACTAGATCGGGAATTAAACTATCAGTGTTTGACAGGATATA
TGGCGGGTA AAC*TGGCATCATGTCGACAAATGGATGTCCAAGATGGACGCAAGGGTGCG*
CGGCCGGCTCCAGAGTATCGCCTTTGGCTGAGCTACATCGGCTACGCCCTAGCCTGCTGTG
GTCTCGTCGCTTCTATGTTACAGATTGACCGCAGTGGCGATAAATGGAACGTCACCTCAATG
GTAGGAGGTGCCATCACACAGCTGGGAATCAAGTCATCACACAATTCTGATCACGTATGC
TGTGGATTGTCATCTGCCACTCGTCCGGCATCGGCGTCTTTGTCAATTCGTGCGTCAGA
TCTGGGGATTCATTGGTCCATTTTGGTTTCGTATTATATCCCCATCAACACATATGTTTACTAAGT
AAATACACAAGGTTTCTCAGCTGATTGAAGCTATTGGTTTATCGGGAACGGCCGGGGTTGC
CGCTGGAATGATTGTTGGCGTGCAGTGGTGCTCACAGTACTGCTGCAATGGCAGTCTGGT
GCTTGGCGCCCTGGTTCTCAGGATAAGGCAGCTTAACTCATGAAAATACAACACTCAGTTA
*CAATTGACGCTCGA*CCAGCTCGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTT
CTTAAGATTGATCATCGCAAGACCGGCAACAGGATT

图 4 反向 PCR 产物序列及分析

Fig. 4 Analysis of the sequence of the inverse PCR product. IP-1 and IP-1 primer sites are underlined with straight lines. T-DNA sequences are located in two separate boxes. The partial sequence of T-DNA right border is marked with one wavy line. The italic sequence represents T-DNA flanking sequence in the insertion site of *A. niger* genome. The restriction enzyme site of *Taq* I is underlined with double straight lines.

基因, 与获得序列存在程度较低的同源性(见表 2), 这可能与实验菌株间差异相关。黑曲霉中的这两个

基因虽然编码假定蛋白, 但是均与酵母中的 MFS 蛋白存在一定的同源性。

表 2 T-DNA 插入位点序列分析

Table 2 Homology search of the T-DNA insertion site sequence

Organism	Accession	Description	Maximal identity/%
<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL181	XP_001265412.1	putative MFS transporter	50
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1293	XP_749986.1	putative MFS transporter	51
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357	XP_002380112.1	putative MFS multidrug transporter	51
<i>Penicillium marneffeii</i> ATCC18224	XP_002152902.1	putative MFS transporter	50
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL1	XP_001269894.1	putative MFS transporter	48
<i>Aspergillus niger</i>	XP_001389854.1	hypothetical protein, An01g14660	47
<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC10500	XP_002486650.1	putative MFS multidrug transporter	49
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1293	XP_751448.1	putative MFS multidrug transporter	47
<i>Aspergillus niger</i>	XP_001389292.1	hypothetical protein An01g08700	44

3 讨论

基因组测序对研究真菌遗传与生理多样性具有重要意义。截至目前,美国生物信息中心已经公开发布 92 种真菌基因组的完成序列,但是基因组注释研究还处于相对较低的水平。与原核生物相比,适用于真菌研究的遗传系统较少,因此建立完善高效的转化系统是构建突变子文库的重要前提。本研究建立了农杆菌介导转化黑曲霉分生孢子体系,转化效率为 5.6×10^2 转化子/ 10^8 分生孢子,是以前报道转化分生孢子效率的 10 倍左右^[6],两者转化条件基本相同,转化率差异的主要原因应该是农杆菌菌株和黑曲霉菌株的差异造成的,后者使用是农杆菌 *A. tumefaciens* strain LBA1100 和黑曲霉 *A. niger* var. *niger* ATCC9029, CBS120.49^[6]。

产孢过程是丝状真菌重要的生长阶段。在烟曲霉的生孢过程中,超过 1000 种基因的转录水平明显升高^[14]。研究显示,转录调节因子 BrlA 与 StuA 是控制生孢过程的关键因子^[15-16],调节包括 MFS 蛋白在内的数百个基因的表达。在 $\Delta brlA$ 或 $\Delta stuA$ 突变子中,编码毒素外排泵 MFS 蛋白与编码转运 siderophore 的 MFS 蛋白基因的表达水平升高,而编码另外两种 MFS 蛋白基因的表达水平下降,其中一种为假定糖转运蛋白^[17],因此 MFS 超级蛋白家族可能与生孢过程密切相关,本研究的发现也证实了这一点。对产孢缺陷突变子 T-DNA 插入位点序列的分析表明,被阻断的基因与多种 MFS 蛋白具有较高的同源性。MFS 超级蛋白家族存在于几乎所有的生物中,目前已知的主要作用为利用能量进行各种化合物的跨膜运输,属于次级转运系统(secondary transport systems)^[11]。MFS 蛋白与生孢过程的具体关系,还需要进一步实验进行深入地研究。

参考文献

[1] Baker SE. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. *Medical Mycology September*, 2006, 44: 17-21.

[2] Pel HJ, Winde JH de, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 2007, 25: 221-231.

[3] Michielse CB, Hooykaas PJJ, Hondel CAMJJ van den, Ram AFJ. *Agrobacterium* - mediated transformation as a

tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*, 2005, 48: 1-17.

[4] Meyer V, Mueller D, Strowig T, Stahl U. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Current Genetics*, 2003, 43: 371-377.

[5] Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 2001, 91: 173-180.

[6] Groot MJ de, Bundock P, Hooykaas PJ, Beijersbergen AG. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 839-842.

[7] Michielse CB, Hooykaas PJJ, Hondel CAMJJ van den, Ram AFJ. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nature Protocols*, 2008, 3: 1671-1678.

[8] Sugui JA, Chang YC, Kwon-Chung KJ. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. *Applied And Environmental Microbiology*, 2005, 71: 1798-1802.

[9] Narasimha G, Sridevi A, Viswanath B, Chandra MS, Reddy BR. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5: 472-476.

[10] Michielse CB, Ram AFJ, Hooykaas PJJ, Hondel CAMJJ van den. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus awamori* in the absence of full-length VirD2, VirC2, or VirE2 leads to insertion of aberrant T-DNA structures. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (7): 2038-2045.

[11] Ras D den, Hooykaas PJJ. Electroporation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Methods of Molecular Biology*, 1995, 55: 63-72.

[12] Mahmood T, Zar T, Saqlan Naqvi SM. Multiple pulses improve electroporation efficiency in *Agrobacterium tumefaciens*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2008, 11: 1-4.

[13] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols*, 1990, 9: 315-322.

[14] Timberlake WE. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Development Biology*, 1980, 78: 497-510.

- [15] Adams TH, Boylan MT, Timberlake WE. brlA is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 1988, 54:353-362.
- [16] Miller KY, Wu J, Miller BL. StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Development*, 1992, 6:1770-1782.
- [17] Twumasi-Boateng K, Yu Y, Chen D, Gravelat FN, Nierman WC, Sheppard DC. Transcriptional profiling identifies a role for BrlA in the response to nitrogen depletion and for StuA in the regulation of secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*, 2009, 8(1):104-115.
- [18] Stergiopoulos I, Zwiers LH, Waard MA De, Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily. *European Journal of Plant Pathology*, 2002, 108:719-734.

***Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Aspergillus niger* conidiospores and sequence analysis of T-DNA insertion site in conidiation-defective mutant**

Wen Huang, Hongjiang Yang^{*}, Huibin Qin

Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: [**Objective**] Development of a method of transforming *Aspergillus niger* conidiospores with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA system and using it as a tool for genome annotation via construction a T-DNA insertion mutant library of *A. niger*. [**Methods**] *A. tumefaciens* EHA105 carrying the binary vector pCAMBIA1301 was used to transform *A. niger* conidiospores under induction conditions. Hygromycin resistant transformants were screened on the selected medium. Sequence analysis was performed using inverse PCR method in stable mutants. [**Results**] In total, 193 hygromycin resistant stable transformants were obtained and the transformation rate was about 5.6×10^2 transformants / 10^8 conidiospores. Obvious morphological changes were observed in some mutants and sequence analysis of T-DNA inserted site was performed in one conidiation-defective mutant. The result showed that the interrupted gene belonged to major facilitator superfamily (MFS). [**Conclusion**] Our results indicated that the transformation system of *A. niger* conidiospores set up in this study, combining with sequence analysis of T-DNA insertion site, might be an effective way for genome annotation in *A. niger*.

Keywords: *Aspergillus niger* conidiospores, *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation, T-DNA, inverse PCR

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Grant from Tianjin Natural Science Foundation (08JC26600) and by the faculty start-up fund from Tianjin University of Science & Technology (20070436)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-22-60601396; E-mail: hongjiangyang@tust.edu.cn

Received: 2 August 2010 / Revised: 8 September 2010