

灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 基因组中 T-DNA 整合模式分析

刘佳, 张剑云, 朱廷恒*, 汪琨, 崔志峰

浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310014

摘要:【目的】研究灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 基因组中 T-DNA 插入位点的整合模式特征。【方法】利用农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导法构建灰葡萄孢菌 T-DNA 插入突变体库。利用热不对称交错 PCR (TAIL-PCR) 技术对转化子中 T-DNA 的旁侧序列进行扩增和克隆, 对获得的旁侧序列进行比对分析。【结果】T-DNA 插入在灰葡萄孢菌基因组非编码区的占 69%, 插入在外显子的占 30%。T-DNA 在插入的过程中发生了碱基缺失、增加等重组现象, 其中左边界 (left border, LB) 整合到基因组碱基缺失较少, 有的保持完整, 而右边界 (right border, RB) 及其近邻的 T-DNA 区域缺失碱基较多。T-DNA 的插入位点还发现有额外的序列插入。【结论】对灰葡萄孢菌中插入 T-DNA 的整合模式的分析为开展该菌的功能基因组学奠定了基础。

关键词: 灰葡萄孢, T-DNA, TAIL-PCR

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 02-0203-05

灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 是一种典型的死体营养型植物病原真菌, 引起 200 多种植物的灰霉病, 包括许多经济作物例如番茄、黄瓜、葡萄等, 引起果实蔬菜腐烂, 造成严重的经济损失^[1]。但是, 目前对灰葡萄孢的致病机制的认识还不够深入, 仅了解一些水解酶、几丁质酶和毒素等的作用, 一些重要的致病相关基因还有待于发现和研究, 从而深入揭示该菌的致病分子机制并设计病害防治的策略。

已经有 2 个灰葡萄孢菌株的全基因组测序已经完成, 这大大地加速了利用反向遗传学的方法对灰葡萄孢菌进行大规模的功能基因组学的研究。根癌农杆菌介导的 T-DNA 转化法 (*Agrobacterium tumefaciens* mediated-transformant, AMT) 已成为当前丝状真菌功能基因组学研究的高效方法之一^[2]。由于外源 T-DNA 的插入引起所在位置基因的功能丧失, 得到相应的表现型, 进一步根据 T-DNA 标签就可以分离目标基因。因此, 利用农杆菌介导法对

灰葡萄孢菌进行插入突变, 就可以获得致病突变体, 进一步克隆相关基因。

T-DNA 整合到植物、真菌等染色体上的机理是复杂的, 在整合的过程中 T-DNA 可以发生重组、丢失、重复等情况^[3-6]。对 T-DNA 在宿主基因组中的整合位点的序列分析有助于了解其插入整合机制, 有助于功能基因组研究。热不对称交错 PCR (thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction, TAIL-PCR)^[7] 方法对确定 T-DNA 插入位点旁侧序列非常有效。稻瘟菌 (*Magnaporthe oryzae*) 基因组中 T-DNA 的插入整合情况已有相关研究^[4, 8], 但是灰葡萄孢菌基因组中 T-DNA 插入位点的研究尚未见报道。为了加速对灰葡萄孢菌这一重要的植物病原真菌的功能基因组学研究, 我们利用 AMT 法构建了灰葡萄孢菌的 T-DNA 插入突变体库^[9], 目的是克隆致病相关基因。为了分析 T-DNA 在灰葡萄孢中的插入位点的整合情况, 本研究中继续构建了

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

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

作者简介: 刘佳 (1985 -), 女, 浙江宁波人, 硕士研究生, 从事植物病原真菌分子生物学研究。

收稿日期: 2010-10-08; **修回日期:** 2010-11-17

突变体并利用 TAIL-PCR 技术对转化子中 T-DNA 旁侧序列进行了克隆,进一步对其进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 灰葡萄孢菌 (*B. cinerea*) 单倍体菌株 B05.10 由德国明斯特大学 Paul Tudzynski 教授赠送。根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) 菌株为 AGL1。

1.1.2 主要试剂和仪器: 头孢霉素、乙酰丁香酮购自上海生工生物技术公司。潮霉素购自杭州昊新生物技术公司, Taq 酶购自上海浩嘉生物技术公司。真菌基因组 DNA 提取采用杭州博日生物公司的 Biopsin 试剂盒。

1.2 载体、引物和测序

所用的双元载体质粒为 pCambia1390 (澳大利亚国际农业分子生物学应用中心惠赠) 以及将 pCambia1300 中启动子 CaMV35S 置换为真菌强启动子 TrpC 的双元载体 pATMT^[10] (浙江大学王政逸教授惠赠)。双元载体中 T-DNA 区域和 TAIL-PCR 引物模式如图 1 所示 (图 1)。引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。测序由杭州华大基因公司完成, 每个克隆进行正反双向测序, 确保序列的正确性。

1.3 农杆菌介导的灰葡萄孢转化及转化子鉴定

农杆菌介导的灰葡萄孢转化参见本研究小组报道的方法^[9]。获得潮霉素抗性稳定遗传的转化子

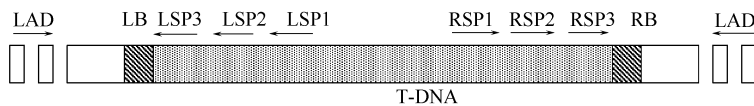


图 1 双元载体中 T-DNA 区域模式图

Fig. 1 Illustration of T-DNA region in binary vector. (LAD, arbitrary degenerate primer; LB, left border; RB, right border; LSP1-3, left specific primer; RSP1-3, right specific primer).

1.5 T-DNA 插入灰葡萄孢基因组交界区的 PCR 验证

为了验证 TAIL-PCR 结果的可靠性, 根据 TAIL-PCR 扩增的 T-DNA 旁侧序列测序结果设计引物, 和 T-DNA 中的载体特异性序列组成引物对, 以各转化子的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 产物克隆测序后和 TAIL-PCR 产物测序结果进行比对, 验证交界区序列的可靠性。PCR 反应程序和条件参考潮霉素基因的扩增程序。

1.6 PCR 克隆、测序和分析

第 3 轮 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 用 EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (BIO BASIC INC, Canada) 进行目标 DNA 片段回收。回收产物

后进行基因组 DNA 提取和分子鉴定。灰葡萄孢菌株在 23℃、PDA 固体培养基上培养后收集菌丝用于基因组 DNA 提取。利用 PCR 技术检测插入的潮霉素抗性基因, 潮霉素抗性基因引物对为: hptF: 5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGA-3'/ hptR: 5'-CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG-3'。

1.4 T-DNA 插入侧翼序列的 TAIL-PCR 扩增

采用改良的高效 TAIL-PCR 技术^[7] 进行。TAIL-PCR 引物示意图见图 1。用于扩增二元载体 pCambia1390 产生的转化子 T-DNA 旁侧序列的嵌套特异引物见报道文献^[9]。用于扩增二元载体 pATMT 产生的转化子 T-DNA 旁侧序列的嵌套特异引物为: RSP1 (5'-CCAACAGTTGCCGACCTGAAT-3'), RSP2 (5'-GGCGAATGCTAGAGCAGCTT-3') 和 RSP3 (5'-CCCGCCTTCAGTTTAACTAT-3')。简并引物参照文献^[7] 设计合成。TAIL-PCR 包括 3 轮反应, 第一轮以 100 ng 基因组 DNA 为模板, 反应体系 20 μL, 包括 2 μL dNTP (2.5 mmol/L)、1.5 μL 引物 RSP1 (10 μmol/L)、4 μL 简并引物 (10 μmol/L)、0.18 μL Taq 酶 (5U/μL) 和 ddH₂O; 第一轮反应产物稀释 20 倍后, 取 1 μL 作为第二轮反应的模板 DNA, 特异引物为 RSP2, 其余同第一轮; 第二轮产物稀释 20 倍, 取 1 μL 作为第三轮的模板 DNA, 特异引物为 RSP3。最后对三轮 PCR 产物同时进行琼脂糖凝胶电泳分析。

用载体 pMD19-T (TaKaRa, 大连) 进行克隆后用于序列测定。序列输入 Broad Institute 灰葡萄孢基因组测序数据库 (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/botrytis_cinerea) 进行 Blast 搜索。序列比对分析采用软件 DNASTar 进行。

2 结果和分析

2.1 T-DNA 插入灰葡萄孢菌突变体构建和分子鉴定

用农杆菌介导法共获得了 465 个 T-DNA 插入的灰葡萄孢菌转化子。每 10⁶ 个孢子平均可获得约 150 (200 个左右的转化子, 转化率低于稻瘟菌等转化技术较为成熟的真菌。两个不同的双元载体对灰

葡萄孢菌的转化率不同, pCambia11390 的转化率略低于 pATMT 转化率。通过含潮霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的培养基上继代 5 次后稳定遗传的转化子经基因组 DNA 提取和 PCR 鉴定, 结果显示都含有潮霉素基因(图 2), 说明这些转化子中都含有 T-DNA 插入, 可以用于 T-DNA 的旁侧序列分析。

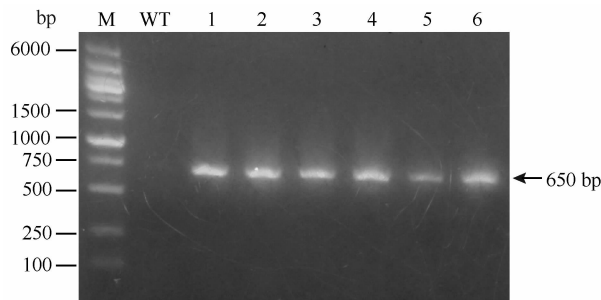


图 2 部分灰葡萄孢菌 T-DNA 转化子的潮霉素抗性基因 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR amplification of hygromycin resistance gene from some T-DNA transformants of *Botrytis cinerea*. M, Standard DNA molecular weight marker; WT, Wild type *B. cinerea*; 1-6, Transformants.

2.2 突变体中 T-DNA 旁侧序列的克隆

对转化子进行表型鉴定筛选后, 对部分转化子进行插入 T-DNA 的旁侧序列克隆。使用 3 个嵌套的特异性引物与 6 个简并引物组合进行 TAIL-PCR, 成功扩增并回收了 36 个 T-DNA 右边界侧翼片段及 12 个左边界侧翼片段, 并对其进行了序列测定, 其中 43 个测序成功, 5 个测序失败。

对 43 个测序成功的片段序列进行载体序列去除, 输入灰葡萄孢菌基因组数据库进行 Blast 搜索后, 发现这些片段都能在基因组中找到同源区域。同源性分析表明, 少数几个片段的同源性略低(序列长度在 35 bp 以下, 同源性在 93% - 96% 范围内), 绝大部分片段同源性均在 98% 以上, 表明扩增出的这 43 个侧翼序列确是灰葡萄孢序列。43 个片段的序列分析显示, 有 13 个(30%) T-DNA 插入发生在预测的外显子上, 30 个(69%) 则插入在非编码区, 其中 3 个(6.9%) 插入在启动子区域。

为了验证上述 TAIL-PCR 扩增的片段序列可靠性, 又利用测序结果设计了特异性引物对转化子的 T-DNA 和基因组交界区进行了 PCR 扩增, 测序结果通过和 TAIL-PCR 扩增片段的序列对比表明, 相似度高达 100%。因此认为 TAIL-PCR 扩增的片段序列正确。

2.3 T-DNA 整合模式分析

对 43 个插入灰葡萄孢菌基因组的 T-DNA 交界区序列进行分析, 结果发现其中的 38 个(88%) 交界区中可以找到完整的 RSP3(LSP3) 序列, 随后的 7

(15 个碱基也保持与原 T-DNA 相同, 而其余 5 例中只找到疑似 RSP3(LSP3) 的不连续序列。对插入的 T-DNA 边界序列进行分析后发现, 左边界(left border, LB)整合到真菌基因组的概率较高, 碱基缺失较少, 有的保持完整, 缺失后的序列和完整的 LB 序列相比相似度在 59% - 90% 范围内。而右边界(right border, RB)及其近邻的 T-DNA 区域缺失碱基较多, 大部分片段的 RB 序列全部丢失。RB 的碱基切除位置则有一定的保守性, 发生在 5'-TTTG-和其后的碱基-A-3'之间。除了碱基丢失, 还发现有额外的序列的插入, 不同插入位置的 T-DNA 中额外插入的碱基序列和长度不同。不同插入位置的 T-DNA 边界区序列比对见图 3-A 和图 3-B。

3 讨论

农杆菌介导的 T-DNA 在宿主基因组的插入方式主要是随机的异常重组(illegitimate recombination), 属于非同源重组(non-homologous), 但也有证据表明插入位点受到 T-DNA 和宿主序列的微同源性(microhomology)影响^[3,11]。T-DNA 的插入可以引起宿主的染色体重排, 包括缺失、倒位和移位等^[5,12]。对 T-DNA 在稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)基因组中插入的研究表明其整合非常复杂, 可能存在多种机制。插入稻瘟菌 T-DNA 的 LB 序列经常被截断(truncated), 插入位点的序列和 LB 的末端有一定的小区域微同源性; 而 RB 序列相对完整, 插入位点不依赖于同源性; 对全基因组的插入位点分析表明, 大多数的插入位点处都有短小缺失(small deletions)^[4,8,13]。本研究表明, 在灰葡萄孢菌中插入 T-DNA 的 LB 序列整合到真菌基因组中能相对保持完整, 碱基缺失较少, 而 RB 及其近邻的 T-DNA 区域缺失碱基较多, 大部分片段的 RB 序列全部丢失。

对稻瘟菌的研究还表明 T-DNA 在基因组的插入分布密度不同, 在非编码区显示处一定插入偏好, 在启动子区域的插入密度高于开放阅读框区域^[12-13], 显示 T-DNA 不是完全随机插入。本研究结果表明灰葡萄孢菌的 T-DNA 中有 69% 的插入在非编码区, 30% 插入在外显子中, 6.9% 插入在启动子区域。该结果与稻瘟菌中的 T-DNA 插入分布情况相似, 表明农杆菌介导的丝状真菌 T-DNA 转化的某些过程或环节中具有共有的调控机制。

农杆菌介导的 T-DNA 插入技术已经成为开展植物病原真菌功能基因组学研究的有效手段^[2], T-DNA 的整合模式在不同的真菌中有所不同, 对灰葡萄孢菌中 T-DNA 整合模式特征进行分子水平上的了解, 有助于该菌功能基因组的开展并为丝状真菌

- grisea*. *Phytopathology*, 2006, 96 (6): S24-S24.
- [5] Zhu CF, Wu JH, He CZ. Induction of chromosomal inversion by integration of T-DNA in the rice genome. *Journal of Genetics Genomics*, 2010, 37 (3): 189-196.
- [6] Kim SI, Veena, Gelvin SB. Genome-wide analysis of *Agrobacterium* T-DNA integration sites in the *Arabidopsis* genome generated under non-selective conditions. *Plant Journal*, 2007, 51(5): 779-791.
- [7] Liu YG, Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *Biotechniques*, 2007, 43 (5): 649-656.
- [8] Choi J, Park J, Jeon J, Chi MH, Goh J, Yoo SY, Park J, Jung K, Kim H, Park SY, Rho HS, Kim S, Kim BR, Han SS, Kang S, Lee YH. Genome-wide analysis of T-DNA integration into the chromosomes of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Microbiology*, 2007, 66 (2): 371-382.
- [9] 冯娟,朱廷恒,汪琨,崔志峰. 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. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50 (2): 169-173.
- [10] 刘朋娟,王政逸,王秋华,李德葆. 农杆菌介导的稻瘟病菌转化及致病缺陷突变体筛选. 中国水稻科学 (*Chinese Journal of Rice Science*), 2006, 20 (3): 231-237.
- [11] Muller AE, Atkinson RG, Sandoval RB, Jorgensen RA. Microhomologies between T-DNA ends and target sites often occur in inverted orientation and may be responsible for the high frequency of T-DNA-associated inversions. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(5): 617-630.
- [12] Li GH, Zhou ZZ, Liu GF, Zheng FC, He CZ. Characterization of T-DNA insertion patterns in the genome of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Current Genetics*, 2007, 51 (4): 233-243.
- [13] Meng Y, Patel G, Heist M, Betts MF, Tucker SL, Galadima N, Donofrio NM, Brown D, Mitchell TK, Li L, Xu JR, Orbach M, Thon M, Dean RA, Farman ML. A systematic analysis of T-DNA insertion events in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics Biology*, 2007, 44 (10): 1050-1064.

Analysis of T-DNA integration pattern in *Botrytis cinerea* genome

Jia Liu, Jianyun Zhang, Tingheng Zhu*, Kun Wang, Zhifeng Cui

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

Abstract: [**Objective**] To analyze the T-DNA integration pattern in the genome of grey mold *Botrytis cinerea*. [**Methods**] T-DNA (Transfer DNA) inserted mutant library of *Botrytis cinerea* was created by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. By using TAIL-PCR (Thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction), we amplified and cloned the chromosomal regions flanking T-DNA insertions. The obtained T-DNA flanking sequences were subjected to alignment with standard T-DNA border sequence for identification and analysis of integration. [**Results**] Up to 69% T-DNA inserted at noncoding regions and 30% inserted at exons. Recombination including deletion or addition of bases in T-DNA region was observed. The right borders of the T-DNA were frequently truncated, and by contrast the left borders were less prone to degradation and appeared to have been inserted in a relatively integrated manner. Extra sequence additions also occurred in T-DNA integration sites. [**Conclusion**] Analysis of T-DNA integration pattern in *B. cinerea* genome will stimulate the functional genomics study of this fungus.

Keywords: *Botrytis cinerea*, T-DNA, TAIL-PCR

(本文责编:张晓丽)