

# 希金斯刺盘孢 T-DNA 插入突变体表型筛选及其特性分析

周 鹏<sup>1,2</sup> 顾琼楠<sup>3</sup> 黄俊斌<sup>2</sup> 郑 露<sup>2</sup>

1.湖北省烟草公司襄阳市公司,襄阳 441100;

2.华中农业大学植物科学技术学院/湖北省作物病害监测与安全控制重点实验室,武汉 430070;

3.湖北省农业科学院植保土肥研究所/农业农村部华中作物有害生物综合治理重点实验室/  
农作物重大病虫害防控湖北省重点实验室,武汉 430064

**摘要** 以希金斯刺盘孢菌株 Ch-1 为供试野生型菌株,通过农杆菌介导转化方法获得含 2 000 个转化子的 T-DNA 插入突变体库,筛选菌落生长异常或致病缺陷突变体,分析致病缺陷突变体的 T-DNA 插入拷贝数和位点。结果显示,筛选到 14 株菌落异常突变体,包括 2 株生长缓慢突变体 Ch-1-E393 和 Ch-1-C135、12 株菌落形态异常突变体(包括色素异常、菌落扇变或菌丝坍塌现象),另外筛选到 1 株致病缺陷突变体 Ch-1-G090。致病性测定结果表明,致病缺陷突变体 Ch-1-G090 接种拟南芥后,叶片发病明显减弱,且未产生水渍状病斑。显微观察发现该突变体分生孢子在叶片上仅能产生少量初生菌丝,不能正常形成次生菌丝。Southern 杂交显示,致病缺陷突变体 Ch-1-G090 为 T-DNA 双拷贝插入;通过 Inverse-PCR 法获得插入 T-DNA 的侧翼序列,明确该突变体 T-DNA 插入位点分别为假定蛋白(Ch063\_10682)和 RNA 加工蛋白 FCF1(CH063\_10671)编码区。

**关键词** 希金斯刺盘孢;农杆菌介导转化;突变体;致病性;插入位点

**中图分类号** S 436 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)04-0033-07

十字花科植物炭疽病是一类重要的世界性植物真菌病害,主要侵染大白菜、菜心、油菜、甘蓝、萝卜、拟南芥等多种十字花科植物,广泛分布于中国、印度、日本、美国等国家<sup>[1-2]</sup>。其中,白菜类和菜心类炭疽病在我国各地发生尤为严重,感病叶片产生典型的水渍状病斑,既影响蔬菜的外观及品质,又造成减产,严重时田块损失率一般可达 30%~40%,甚至绝收<sup>[3]</sup>。引起该病的病原菌是有丝分裂孢子类真菌、刺盘孢属(*Colletotrichum*)、希金斯刺盘孢(*C. higginsianum*),因其生产上的重要性、遗传转化可操作性以及致病过程的代表性,通常用作研究植物病原真菌与寄主互作机制的理想系统。

希金斯刺盘孢基因组中功能基因的发掘和鉴定是了解半活体营养植物病原真菌生长发育以及致病机制的重要基础。根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的转化法(ATMT)是研究得最深入、技术方法最成熟的遗传转化技术之一<sup>[4-6]</sup>。迄今,在希金斯刺盘孢基因组中鉴定的功能基因较少,

目前有近 10 个与生长发育或致病有关的基因被报道。如希金斯刺盘孢精氨酸合成途径相关基因<sup>[7]</sup>、假定蛋白编码基因 *ChMel1*<sup>[8]</sup>、质膜质子泵 *ChPma2*<sup>[9]</sup>、MAPK 途径相关基因<sup>[10-11]</sup>、Ras 信号途径调控因子 *ChRgf1*<sup>[12]</sup>、MFS 转运蛋白 *ChMfs1*<sup>[13]</sup>、乙酰辅酶 A 合成酶 *ChAcs1*<sup>[14]</sup> 等。大部分基因通过筛选 T-DNA 插入突变体库的方法获得,说明外源 DNA 插入突变是发掘功能基因的有效途径。

本研究采用 ATMT 方法,以潮霉素 B 为筛选标记、构建希金斯刺盘孢 T-DNA 插入突变体库;对 T-DNA 插入突变体的生物学表型、致病性以及 T-DNA 插入位点进行的研究,以期为深入探讨希金斯刺盘孢发育和致病机制提供材料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

希金斯刺盘孢(*C. higginsianum*)转化用出发菌株为 Ch-1,由加拿大 Saskatchewan 大学生物系

收稿日期:2019-01-22

基金项目:国家自然科学基金项目(31101399)

周 鹏,硕士,科员.研究方向:植物真菌病害. E-mail: 972513466@qq.com

通信作者:郑 露,博士,副教授.研究方向:植物真菌病害与分子植物病理. E-mail: luzheng@mail.hzau.edu.cn

卫扬斗教授提供;根癌农杆菌(*A. tumefaciens*)菌株 EHA105 和双元载体 pTFCM 均由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室姜道宏教授提供。

抗生素和试剂:卡那霉素、头孢霉素、乙酰丁香酮(AS)购自于 Gibco 公司,氨基青霉素、利福平、链霉素购自于 Ameresco 公司,潮霉素 B 购自于 Roche 公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  感受态细胞、载体 pMD18-T 及限制性内切酶、T4 连接酶等均由 TaKaRa 公司提供。

MM 基础培养基、IM 诱导培养基和 Co-IM 共培养诱导培养基参照文献[9]配制;LB 培养基、PDA 培养基参照文献[15]配制。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)生态型 Col-0 用于致病性测定,播种后 4 周供接种用。

## 1.2 希金斯刺盘孢的 T-DNA 插入突变体库构建

供试菌株 Ch-1 接种于 PDA 平板上,25 ℃ 培养 7 d 后,用无菌水将平板上分生孢子洗下,擦镜纸过滤得到分生孢子悬浮液,浓度调为 10<sup>6</sup> 个/mL 用于转化。挑取农杆菌菌株 EHA105 单菌落接种于含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 LB 中,振荡培养(28 ℃、220

r/min)16 h,接于 50 mL MM 培养基,振荡培养 2 d 至 OD<sub>600</sub> = 0.3,用 IM 培养基稀释,继续培养 2 h,用该培养菌液制备的分生孢子悬浮液制成共混液,在 180 r/min 摇培 2 h,取 200  $\mu\text{L}$  涂布于铺有玻璃纸 Co-IM 平板上,置于 25 ℃ 培养;3~4 d 后将长有细微菌落的玻璃纸转到含 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  头孢霉素和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  潮霉素 B 的 PDA 平板上,放置于 25 ℃ 条件培养;3~4 d 后即有假定转化子菌落长出。

## 1.3 转化子的遗传稳定性和 PCR 鉴定

转化子在 PDA 平板上连续继代培养 3 代,转至含潮霉素 B(30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 PDA 培养基上,25 ℃ 暗培养 5 d 后观察记录菌株生长情况。

转化子采用 CTAB 法提取 DNA,以其总 DNA 为模板,hph-F 和 hph-R 为引物进行潮霉素抗性基因片段的 PCR 扩增(表 1)。以希金斯刺盘孢野生型菌株 Ch-1 的基因组 DNA 为阴性对照,pTFCM 载体为阳性对照。反应体系总体积 20  $\mu\text{L}$ ,反应条件:第 1 步,94 ℃ 5 min;第 2 步,94 ℃ 1 min,56 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;第 3 步,72 ℃ 10 min。在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测扩增产物条带大小。

表 1 供试引物及序列

Table 1 Primers and their sequences used in the work

引物 Primer	序列 Sequence	描述 Description
hph-F	5'-CAGCGTCTCCGACCTGAT-3'	<i>hph</i> 特异引物 <i>hph</i> specific primer
hph-R	5'-TCTGCGGGCGATTTGT-3'	<i>hph</i> 特异引物 <i>hph</i> specific primer
hph-sp	5'-AGCGTCTCCGACCTGATG-3'	<i>hph</i> 探针引物 <i>hph</i> probe primer
hph-ap	5'-TTCTGCGGGCGATTTGTG-3'	<i>hph</i> 探针引物 <i>hph</i> probe primer
Pttrpc	5'-ATGTCCTCGTTCTCTGTCTGCTAATA-3'	Inverse-PCR 左侧引物 Left primer for inverse-PCR
LB-1	5'-AGGGTTCTATAGGGTTTCGCTCATG-3'	Inverse-PCR 左侧外引物 Outer primer for inverse-PCR in left side
LB-3	5'-GAATTAATTCGGCGTAAATTCAGT-3'	Inverse-PCR 左侧内引物 Inner primer for inverse-PCR in left side
RBGUS02	5'-TGCTCTAGCATTCGCCATTCAGG-3'	Inverse-PCR 右侧引物 Right primer for inverse-PCR
RB-1	5'-GATTGAATCCTGTTGCCGCTTTG-3'	Inverse-PCR 右侧外引物 Outer primer for inverse-PCR in right side
RB-3	5'-GCGCAAAGTAGGATAAAATTATC-3'	Inverse-PCR 右侧内引物 Inner primer for inverse-PCR in right side

## 1.4 转化子的菌落形态观察

以野生型菌株作为对照,将转化子活化后打取直径 5 mm 菌丝块接到 PDA 平板中央,置于 25 ℃ 培养箱,7 d 后观察菌落形态并测量菌落直径(十字交叉法),筛选生长及菌落形态异常的转化子。每个转化子重复 3 次。

## 1.5 转化子的致病性测定

将转化子和野生型菌株转至 PDA 平板上,培养 7 d 后用无菌水轻轻洗掉培养基上的孢子,擦镜纸过滤后获得分生孢子悬浮液,浓度调至 10<sup>6</sup> 个/mL。用孢子液进行活体接种试验,点接 4 周大小的拟南芥健康叶片,即用微量移液器吸取 10  $\mu\text{L}$

孢子悬浮液滴到叶片上,每片叶点接 2 点;25 °C 覆膜保湿培养,每天观察发病情况。每个转化子重复 3 次。

### 1.6 转化子的侵染过程观察

对筛选到的致病缺陷型转化子进一步观察和统计侵染结构形成情况。接种 4 d 后,在叶片上切取接种点 0.25 cm<sup>2</sup>, 甲醇/氯仿/冰醋酸(体积比 6:3:1)脱色液脱色;之后用乙醇梯度补水<sup>[16]</sup>,即将叶片依次放入 90%(2 h)、70%(12 h)、50%(2 h)、30%(2 h)的乙醇和蒸馏水中(2 h);用台酚蓝染液(2%)染色 12 h 后,在普通光学显微镜下统计转化子在侵染叶片中附着胞、初生菌丝、次生菌丝形成情况。

### 1.7 T-DNA 插入位点侧翼序列的克隆、测序和分析

参考 Sambrook 等<sup>[15]</sup>的方法,采用 Southern 杂交验证转化子的 T-DNA 插入拷贝数。用 CTAB 法提取基因组 DNA,用限制性内切酶 *Sac* I 酶切,电泳后转到尼龙膜上,采用紫外交联仪将核酸固定。以 pTFCM 质粒为模板,引物 *hph*-sp/*hph*-ap 扩增 *hph* 片段(表 1),参考高效 DNA 地高辛标记和检测试剂盒,采用随机引物 DNA 标记法制备探针。杂交完成后进行洗膜及压片。

采用 Inverse-PCR 法扩增转化子的 T-DNA 侧翼序列。用 *Sac* I 酶切转化子的基因组 DNA,使用 T4-DNA 连接酶连接酶切产物,PCR 清洁试剂盒清洁后,用冰无水乙醇沉淀。干燥后用 ddH<sub>2</sub>O 溶解用于 Inverse-PCR 扩增。根据引物设计原则设计反向 PCR 引物(表 1);以 P|pc、LB-1 为引物进行左侧一扩,以 P|pc、LB-3 为引物进行左侧二扩。以 RBGUS02、RB-1 为引物进行右侧一扩,以 RBGUS02、RB-3 为引物进行二扩。反应程序:第 1 步,94 °C 5 min;第 2 步,94 °C 30 s,55 °C 40 s,72 °C 50 s,共 35 个循环;第 3 步,72 °C 10 min。2 轮扩增后,扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分离,回收目标片段,PCR 鉴定的阳性克隆送上海桑尼生物科技有限公司测序。序列拼接后在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库进行 Blastp 同源性比对,并对突变体中 T-DNA 插入基因功能进行预测。
|  |

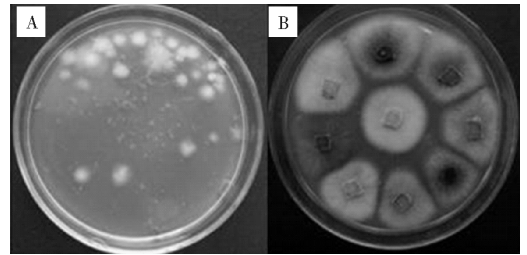
### 1.8 数据分析

在 DPS 软件(版本 3.01)中用 LSD 法进行方差分析,比较处理间的差异显著性( $\alpha=0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 希金斯刺盘孢 T-DNA 插入突变体库构建及转化子分析

通过 ATMT 法构建希金斯刺盘孢的 T-DNA 插入突变体库,共获得 2 000 个转化子。随机挑选 12 个假定转化子在 PDA 平板上生长,每隔 7 d 传代 1 次,共 3 次,转至潮霉素平板后供试转化子均生长正常。可见,本研究建立的突变体库 T-DNA 插入转化子基因组的概率很高(图 1)。

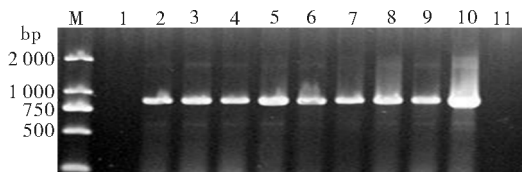


A: 在选择性培养基上生长的转化子; B: 随机挑选转化子的遗传稳定性(在 25 °C 生长 5 d)。A: Selective culture; B: Verification of genetic stability (25 °C, 5 d)。

图 1 潮霉素平板上生长的 T-DNA 插入转化子及遗传稳定性鉴定

Fig.1 Genetic stability of T-DNA insertion mutants on PDA plate containing hygromycin

随机选取 8 个转化子,用 *hph* 基因扩增引物进行转化子的 PCR 鉴定。结果表明,8 个 DNA 样品均能扩增出目的片段(图 2),说明 T-DNA 已经成功插入到转化子的基因组中。



M: DL2 000 TM DNA Marker; 1: 野生型菌株 Ch-1; 2~9: 供试 9 个转化子 *hph* 基因扩增结果; 10: 载体对照 pTFCM; 11: 无菌水对照。M: DL2 000 TM DNA Marker; 1: Ch-1; 2-9: PCR amplification of the nine transformants; 10: PCR amplification of vector pTFCM; 11: ddH<sub>2</sub>O。

图 2 希金斯刺盘孢 T-DNA 插入转化子 PCR 鉴定  
Fig.2 PCR amplification of T-DNA insertion mutants of *Colletotrichum higginsianum*

### 2.2 希金斯刺盘孢菌落生长异常突变体分析

以菌株 Ch-1 为对照,分批将 2 000 个转化子转到 PDA 平板上培养,7 d 后观察菌落形态并测量菌

落直径。筛选到 2 株生长缓慢突变体,即 Ch-1-E393 和 Ch-1-C135(图 3);与野生型相比,这 2 株突变体菌落直径明显减小,且差异显著( $P < 0.05$ ) (图 4)。

另外,还筛选到 12 株菌落形态异常突变体

(图 3),包括色素异常、菌落扇变、菌丝坍塌现象;这 12 株菌落形态异常突变体分别为 Ch-1-C251、Ch-1-C136、Ch-1-B14、Ch-1-E104、Ch-1-B121、Ch-1-A17、Ch-1-E375、Ch-1-A12、Ch-1-D102、Ch-1-B35、Ch-1-C148 和 Ch-1-E107。

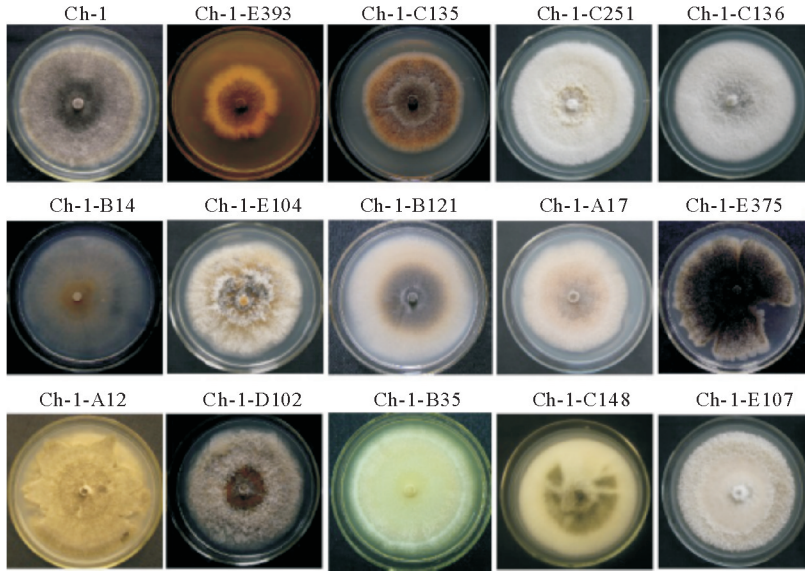


图 3 希金斯刺盘孢菌落异常突变体在 PDA 上培养形态 (7 d)

Fig.3 *Colletotrichum higginsianum* mutants with abnormal colonies on PDA plates (7 d)

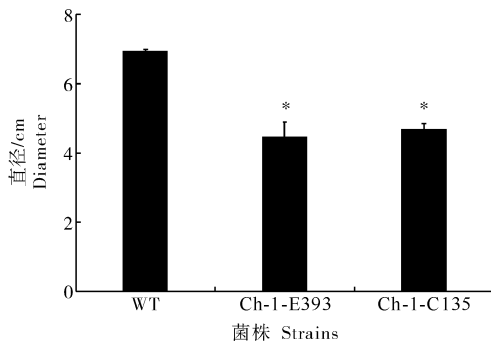
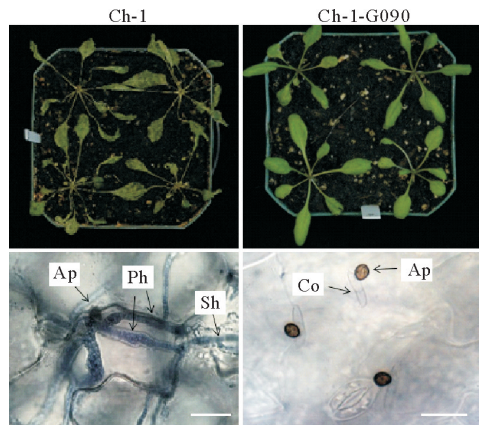


图 4 希金斯刺盘孢生长缓慢突变体在 PDA 上生长 7 d 的菌落直径

Fig.4 Colony diameters of *Colletotrichum higginsianum* growth-deficient mutants on PDA plates (7 d)

### 2.3 希金斯刺盘孢致病缺陷突变体的筛选及侵染特性分析

采用分生孢子液点接拟南芥叶片,从突变体库中筛选到 1 株致病缺陷突变体 Ch-1-G090。与野生型菌株接种相比,突变体 Ch-1-G090 分生孢子悬浮液接种拟南芥 4 d 后,叶片上仅形成不明显的小黑点,且未产生水渍状病斑(图 5)。对接种 4 d 后的拟南芥叶片进行显微观察,发现突变体 Ch-1-G090 的分生孢子可在叶片上正常萌发并形成附着胞,但

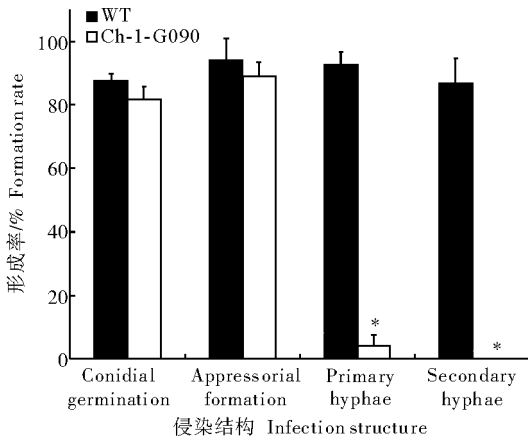


左上图和右上图分别为 Ch-1 和 Ch-1-G090 接种拟南芥叶片发病症状(4 dpi);左下图和右下图分别为 Ch-1 和 Ch-1-G090 侵染组织观察情况(4 dpi);Co 代表分生孢子,Ap 代表附着胞;Ph 代表初生菌丝;Sh 代表次生菌丝;标尺为 10  $\mu\text{m}$ 。The upper left and upper right pictures indicated symptoms developed on *A. thaliana* leaves (4 dpi). The lower left and lower right pictures indicated observation of infection structures in leaves (4 dpi). Co: Conidia; Ap: Appressoria; Ph: Primary hyphae; Sh: Secondary hyphae. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

图 5 希金斯刺盘孢致病缺陷突变体 Ch-1-G090 的致病性及侵染过程

Fig.5 Pathogenicity and infection assays of pathogenicity-deficient mutant Ch-1-G090 of *Colletotrichum higginsianum*

是附着胞形成后仅能产生少量初生菌丝,形成率仅为 4%,而后不能形成次生菌丝(图 5、图 6)。



拟南芥植株分别接种希金斯刺盘孢野生型菌株、突变体 Ch-1-G090。每次重复中转化子最少观察 100 个附着胞,侵染观察重复 3 次独立实验。Arabidopsis leaves were inoculated with conidial suspensions of wild-type and Ch-1-G090. In each experiment, more than 100 appressoria for each transformant were counted. The experiment was repeated three times.

图 6 希金斯刺盘孢致病缺陷突变体 Ch-1-G090 在拟南芥叶片上的侵染结构形成率 (4 dpi)  
Fig.6 Infection structure formations of *Colletotrichum higginsianum* wild-type and Ch-1-G090 on *A. thaliana* leaves (4 dpi)

### 2.4 致病缺陷突变体 Ch-1-G090 的 Southern 杂交检测及 T-DNA 插入位点侧翼序列分析

为了检测希金斯刺盘孢致病缺陷转化子 Ch-1-G090 的 T-DNA 插入拷贝数,对突变体的基因组 DNA 进行 Southern 杂交验证。DNA 经 *Sac* I 酶切后,以 750 bp *hph* 基因片段为探针进行杂交检测(图 7A)。结果发现,致病缺陷突变体 Ch-1-G090 有 2 条杂交条带,证明该突变体为 T-DNA 双拷贝插入(图 7B)。采用 Inverse-PCR 法扩增 T-DNA 侧翼序列,在第 2 轮扩增反应结束后,获得清晰的特异性条带(图 7C)。

将第 2 轮扩增目标片段切胶回收,测序拼接后将 Ch-1-G090 的 T-DNA 侧翼序列与希金斯刺盘孢的全基因组进行比对,并在 NCBI 上进行同源比对,定位 T-DNA 插入位点,并进一步对假定破坏基因进行功能预测。

首先,将第 1 条 327 bp 侧翼序列与希金斯刺盘孢全基因组进行比对,发现该片段与 SuperContig CACQ02003819 的 2 278~2 289 碱基区存在 98.6% 相似性;根据基因组注释发现,该片段为假定蛋白

(Ch063\_10682) 编码区,编码 180 个氨基酸,仅有 1 个外显子(图 8)。同时,将第 2 条 228 bp 侧翼序列与基因组进行比对,与 SuperContig CACQ02003810 的 1 570~1 571 碱基区域有 97.4% 相似性,该片段为 RNA 加工蛋白 FCF1(CH063\_10671)编码区,编码 108 个氨基酸,包括 2 个外显子和 1 个内含子(图 8)。由此,将 Ch-1-G090 的 2 个 T-DNA 插入位点基因分别鉴定为假定蛋白 (Ch063\_10682) 和 RNA 加工蛋白 FCF1(CH063\_10671)。

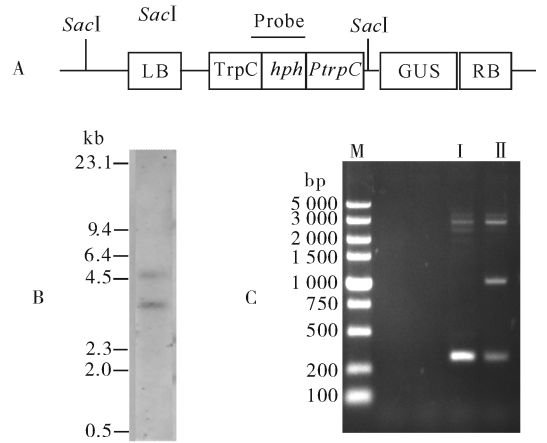


图 7 希金斯刺盘孢致病缺陷突变体的 T-DNA 插入拷贝数及侧翼序列的克隆与分析  
Fig.7 Southern blot analysis and identification of T-DNA flanking sequences of *Colletotrichum higginsianum* mutant Ch-1-G090

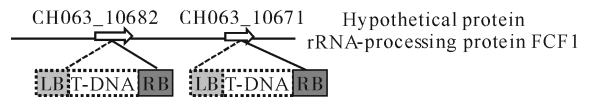


图 8 希金斯刺盘孢致病缺陷突变体 Ch-1-G090 的 T-DNA 插入位点分析  
Fig.8 T-DNA insertion sites in the pathogenicity-deficient mutant Ch-1-G090

## 3 讨论

根癌农杆菌介导转化法在植物病原真菌中应用

广泛,有转化效率高、易于操作、转化受体多样、转化子稳定等优点<sup>[17]</sup>。本研究在获得的 2 000 个转化子的 T-DNA 插入突变体库中,筛选到 2 株生长缓慢突变体、12 株菌落形态异常突变体以及 1 株致病缺陷突变体。总体而言,筛选到的致病缺陷突变体数量较少。其原因主要与接种方法有关,本研究采用的点接法适合快速筛选致病力显著下降或致病力丧失突变体,而不易于筛选到致病力下降不明显的突变体。由于在单位面积上接种孢子数量过多,野生型菌株和致病力下降突变体接种后症状差异相差不多。因此,对于致病力有一定下降的突变体可通过喷雾接种法进一步确定。本研究筛选的致病缺陷突变体 Ch-1-G090 为附着胞穿透阶段存在缺陷,接种叶片病斑产生所需时间较野生型延长。观察侵染结构发现 Ch-1-G090 的分生孢子在叶片上能正常萌发并形成附着胞,但附着胞仅能产生少量初生菌丝。我们推测 Ch-1-G090 突变体的附着胞功能可能出现缺陷。此外,我们分析了 Ch-1-G090 的 T-DNA 插入侧翼序列,其中一个 T-DNA 插入位点在 RNA 加工蛋白 FCF1 的外显子上。前期报道,在酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中也存在 FCF 蛋白,分别为 Fcf1 和 Fcf2<sup>[18]</sup>。在酵母中,Fcf1p 及 Fcf2p 蛋白均定位于核上,且对酵母来说是必须的。降低 Fcf1p 及 Fcf2p 蛋白的表达可导致 18S rRNA 的合成减少,且 40S 核糖体亚基的合成也相应减少。而另 1 个 T-DNA 插入在 1 个假定蛋白上,我们使用假定蛋白(Ch063\_10682)的外显子序列在 NCBI 上进行 Blast 比对,发现其与  $\beta$ -1,6-半乳糖内切酶的 mRNA 序列同源性较高。第 1 个真菌中的  $\beta$ -1,6-半乳糖内切酶是在木霉 (*Trichoderma viride*) 中被报道的<sup>[19]</sup>。 $\beta$ -1,6-半乳糖内切酶可影响真菌阿拉伯半乳糖蛋白的糖分构成,而  $\beta$ -1,6-半乳糖内切酶与真菌致病性是否相关还未有报道。后期研究将会分别对 FCF1 和假定蛋白(Ch063\_10682)进行基因敲除,明确 CH-1-G090 致病减弱的原因。

### 参 考 文 献

- [1] O'CONNELL R, HERBERT C, SREENIVASAPRASAD S, et al. A novel *Arabidopsis-Colletotrichum* pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions[J]. *Molecular plant-microbe interaction*, 2004, 17: 272-282.
- [2] HYDE K D, CAI L, CANNON P F, et al. *Colletotrichum*-names in current use[J]. *Fungal diversity*, 2009, 39: 147-183.
- [3] 杨暹, 冯红贤, 杨跃生. 硅对菜心炭疽病发生、菜薹形成及硅吸收沉积的影响[J]. *应用生态学报*, 2008, 19(5): 1006-1012.
- [4] 方丽, 刘海青, 宋凤鸣, 等. 农杆菌介导的黄瓜炭疽菌遗传转化[J]. *浙江大学学报*, 2006, 32(4): 360-366.
- [5] 王政逸, 王秋华, 李德葆. 根癌土壤杆菌介导的丝状真菌转化[J]. *菌物系统*, 2003, 22(2): 339-344.
- [6] MICHIELSE C B, HOOYKAAS P J J, van den HONDEL C A, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. *Current genetics*, 2005, 48: 1-17.
- [7] TAKAHARA H, HUSER A, O'CONNELL R. Two arginine biosynthesis genes are essential for pathogenicity of *Colletotrichum higginsianum* on *Arabidopsis*[J]. *Mycology*, 2012, 3: 54-64.
- [8] LIU L, ZHAO D, ZHENG L, et al. Identification of virulence genes in the crucifer anthracnose fungus *Colletotrichum higginsianum* by insertional mutagenesis[J]. *Microbial pathogenesis*, 2013, 64: 6-17.
- [9] KORN M, SCHMIDPETER J, DAHL M, et al. A genetic screen for pathogenicity genes in the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum* identifies the plasma membrane proton pump *Pma2* required for host penetration[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125960 [2019-01-21]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125960>.
- [10] YUAN Q F, CHEN M J, YAN Y Q, et al. *ChSte7* is required for vegetative growth and various plant infection processes in *Colletotrichum higginsianum* [J]. *BioMed research international*, 2016, 2016: 7496569 [2019-01-21]. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7496569>.
- [11] WEI W, XIONG Y, ZHU W, et al. *Colletotrichum higginsianum* mitogen-activated protein kinase *ChMK1*: role in growth, cell wall integrity, colony melanization, and pathogenicity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1212 [2019-01-21]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01212>.
- [12] GU Q N, CHEN M J, HUANG J B, et al. Multifaceted roles of the Ras guanine-nucleotide exchange factor *ChRgf* in development, pathogenesis, and stress responses of *Colletotrichum higginsianum*[J]. *Phytopathology*, 2017, 107: 433-443.
- [13] LIU L P, YAN Y Q, HUANG J B, et al. A novel MFS transporter gene *ChMfs1* is important for hyphal morphology, conidiation, and pathogenicity in *Colletotrichum higginsianum* [J]. *Frontiers in microbiology*, 2017, 8: 1953 [2019-01-21]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01953>.
- [14] GU Q, YUAN Q, ZHAO D, et al. Acetyl-coenzyme A synthetase gene *ChAcs1* is essential for lipid metabolism, carbon utilization and virulence of the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum*[J]. *Molecular plant pathology*, 2019, 20(1): 107-123.
- [15] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南 [M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2017: 103-109, 881
- [16] LIU G, KENNEDY R, GREENSHIELDS D L, et al. Detached and attached *Arabidopsis* leaf assays reveal distinctive defense

responses against hemibiotrophic *Colletotrichum* spp.[J]. Molecular plant-microbe interaction, 2007, 20(10): 1308-1319.

[17] 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[J]. 中国生物工程杂志, 2002, 22(5): 40-44.

[18] BOZENNA R, LWONA K, PIEKARSKA I, et al. *Fcf1p* and *Fcf2p* are novel nucleolar *Saccharomyces cerevisiae* proteins

involved in pre-rRNA processing[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2006, 346: 546-554.

[19] KOTAKE T, KANEKO S, KUBOMOTO A, et al. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Trichoderma viride* endo-beta-(1,6)-galactanase gene[J]. Biochemical journal, 2004, 377(3): 749-755.

## Screening and characterization of T-DNA insertion mutants of *Colletotrichum higginsianum*

ZHOU Peng<sup>1,2</sup> GU Qiongnan<sup>3</sup> HUANG Junbin<sup>2</sup> ZHENG Lu<sup>2</sup>

1. Xiangyang Municipal Tobacco Company, Hubei Province, Xiangyang 441100, China;

2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University/  
Key Lab of Plant Pathology, Hubei Province, Wuhan 430070, China;

3. Institute of Plant Protection and Soil Science, Hubei Academy of Agricultural Sciences/  
Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Central China,  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Hubei Key Laboratory of Crop Diseases,  
Insect Pests and Weeds Control, Wuhan 430064, China

**Abstract** In this study, insertional mutagenesis by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT) was used to build a T-DNA insertion library of *Colletotrichum higginsianum* containing a collection of 2 000 insertion mutants. From the library, development and pathogenicity-deficient mutants were screened and T-DNA insertion copies and sites were analyzed. As a result, we isolated 2 growth-deficient mutants Ch-1-E393 and Ch-1-C135 with significant reduced growth on PDA medium, 12 mutants with abnormal colonies and one pathogenicity-deficient mutant Ch-1-G090. Pathogenicity assays showed that after inoculation of the pathogenic defective mutant Ch-1-G090 in *Arabidopsis*, the incidence of leaf diseases was significantly reduced. Under microscope, few primary hyphae were found in the leaves and no secondary hyphae was observed in Ch-1-G090. Southern blot analysis indicated that the mutant Ch-1-G090 harbored two T-DNA insertions. Border flanking sequences of T-DNAs from these mutants were recovered by Inverse-PCR. Sequence analyses revealed that the two T-DNA insertion sites in the mutant Ch-1-G090 were coding genes for a hypothetical protein (Ch063\_10682) and an RNA processing enzyme (CH063\_10671).

**Keywords** *Colletotrichum higginsianum*; *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation; mutant; pathogenicity; insertion site

(责任编辑: 边书京)