

农杆菌介导灰葡萄孢菌株 RoseBc-3 的遗传转化

范 雷 张 静 杨 龙 李 国 庆

华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

摘要 观察了农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导转化灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)菌株 RoseBc-3 的影响因素,并对遗传转化的有效性进行评估。结果表明:农杆菌与灰葡萄孢共培养的温度和灰葡萄孢分生孢子浓度均能影响转化效率,当共培养温度为 22 ℃、灰葡萄孢分生孢子浓度为 1×10^5 个/mL 时,转化效率最高,平均每皿(直径 9 cm)转化子数量超过 100 个;通过特异性引物介导的 PCR 和特异性探针杂交方法,证明所获得的转化子是农杆菌中 T-DNA 插入造成的,且大多数(87.5%)T-DNA 插入为单拷贝插入;从灰葡萄孢 T-DNA 插入体库筛选获得了 6 类突变体,即产孢显著减少或不产孢突变体(占 3.8%)、菌丝生长速率减慢突变体(占 3.5%)、菌丝稀疏突变体(占 1.6%)、菌落颜色异常突变体(占 5.7%)、致病力丧失突变体(占 3.3%)和致病力增强突变体(占 3.0%)。采用反向 PCR 技术和 hi-TAIL PCR 技术从 14 个灰葡萄孢突变体菌株中获得了 T-DNA 侧翼序列,且发现 T-DNA 在基因编码区和非编码区插入的频率是相同的。

关键词 灰葡萄孢;农杆菌;T-DNA;遗传转化;突变体

中图分类号 Q 933; S 482.2⁺92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)02-0030-06

1995 年 Bundock 等^[1]首次实现根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的遗传转化,从此开启了根癌农杆菌转化真菌方法的研究。人们将这种遗传转化方法称之为根癌农杆菌介导的遗传转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation,简称 ATMT)。ATMT 的原理是根癌农杆菌菌体细胞中的 Ti 质粒(或 T-DNA)能够随机插入到真菌核基因组中,从而破坏某些基因的功能,使真菌发生变异。T-DNA 序列在真菌基因组中扮演着标签的角色。根据已知的 T-DNA 序列可以获得其侧翼序列,即被破坏的真菌基因。因此,ATMT 技术是研究真菌功能基因组学的重要工具。

灰葡萄孢(*Botrytis cinerea* Pers.)是一种重要的植物病原真菌^[2],是典型的死体营养型致病菌,由它引起的灰霉病已对多种蔬菜、水果和花卉造成重大的经济损失。前人研究表明,灰葡萄孢通过多种途径侵染植物并引起灰霉病^[3]。目前,灰葡萄孢菌株 B05.10 和 T4 的基因组测序已经完成^[4],但对其致病的分子机制尚不清楚。

2003 年 Rolland 等^[5]首次实现了灰葡萄孢菌株 B05.10 的 ATMT 转化。冯娟等^[6]的研究结果表明,灰葡萄孢的分生孢子浓度是影响 ATMT 转化效率的一个重要因素。灰葡萄孢菌株 RoseBc-3 是从发病月季花瓣分离的一种强致病性菌株,以马铃薯葡萄糖琼脂培养基培养时能产生大量分生孢子和菌核,且其强致病性和培养特征十分稳定,适合作为 ATMT 转化的受体材料,建立 T-DNA 插入突变体库,进而研究灰葡萄孢发育(产生菌核和分生孢子)及其致病分子机制。笔者观察了 ATMT 转化灰葡萄孢菌株 RoseBc-3 的影响因素,筛选了致病力发生变化(增强或减弱)的突变体,旨在为灰葡萄孢菌株 RoseBc-3 的农杆菌介导转化和体系优化以及探讨其致病分子机制提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

供试灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)菌株 RoseBc-3 分离自发病月季花(*Rosa chinensis* Jacq.);根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA105 和质粒

收稿日期:2012-09-08

基金项目:国家自然科学基金项目(30971953,31000877)和国家公益性行业(农业)科研专项(201303025)

范 雷,硕士研究生。研究方向:植物病害生物防治。E-mail: fanlei@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者:李国庆,博士,教授。研究方向:植物病害生物防治。E-mail: guoqingli@mail.hzau.edu.cn

pTFCM 由华中农业大学姜道宏教授赠予;质粒 pTFCM 中含有潮霉素磷酸转移酶基因 *hphB*,由 *trpC* 启动子启动^[7]。

供试培养基包括 Co-Im、LA、LB、MM、IM 和 PDA,其配方与制备均参照李模孝的方法^[7]。培养基的用途将在各试验中分别叙述。

1.2 农杆菌菌液的制备

挑取含有重组质粒 pTFCM 的农杆菌在 LA 培养基上划线培养,挑单菌落于 LB 培养基中,在 28 °C、220 r/min 条件下振荡培养 24 h。取 250 μ L 农杆菌菌液于 50 mL MM 培养液中,在 28 °C、220 r/min 条件下振荡培养 48 h,用 IM 培养液[含乙酰丁香酮 78.48 μ g/mL, 2-(N-吗啉)乙磺酸钠 1.0 mg/mL]将农杆菌菌悬液稀释至 D_{600} 值为 0.15,再在 28 °C、220 r/min 条件下振荡培养 6 h 备用。

1.3 灰葡萄孢菌的转化及体系优化

用 PDA 培养基培养灰葡萄孢菌株 RoseBc-3 (20 °C, 10 d)。用无菌蒸馏水洗下菌落表面的分生孢子。将分生孢子悬浮液通过 4 层灭菌纱布过滤,以除去其中的菌丝片段。用农杆菌细胞悬液稀释灰葡萄孢分生孢子液,使其分生孢子浓度分别达到 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 个/mL。用 Co-Im 培养基制备固体平板,平板表面铺 1 层无菌玻璃纸,分别吸取 200 μ L 各种比例的灰葡萄孢分生孢子和农杆菌细胞的混合溶液,涂布于玻璃纸上,在温度 20、22、28 °C 条件下共培养 2 d。然后将玻璃纸揭起平铺于无菌培养皿底部,在其上覆盖 20 mL 含有潮霉素(50 μ g/mL)和头孢霉素(750 μ g/mL)的 PDA,在 20 °C 条件下培养直至菌落长出,将各菌落分别移植至含有潮霉素(50 μ g/mL)的 PDA 培养基上继续培养,仍能长出的菌落初步定为转化子并分别进行命名和保存。

1.4 转化子的 PCR 鉴定和 DNA 杂交验证

将各灰葡萄孢转化子接种在铺有无菌玻璃纸的 PDA 培养基上,在 20 °C 条件下培养 3 d,收集菌丝,用改良的 CTAB 法提取各转化子菌株的基因组 DNA^[8], -20 °C 保存,用于转化子的 PCR 鉴定和 DNA 杂交验证。

在转化子 PCR 鉴定试验中,根据已知的 pTFCM 质粒上 *hphB* 基因的序列设计合成了 1 对引物(由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成),HYG-F: 5'-GACAGCGTCTCCG ACCTGA-3' 和 HYG-R: 5'-GCTCCATACAAGCCAACCAC-3'。采用该

引物对可扩增出 1 条 674 bp 的 DNA 片段。PCR 程序: 94 °C 5 min; 接着 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 33 个循环; 最后 72 °C 10 min, 16 °C 5 min。

在转化子 DNA 杂交验证试验中,利用 pTFCM 质粒上仅有 1 个酶切位点,且在 *hphB* 基因中没有酶切位点的限制性内切酶 *Sac* I 或 *Xho* I 对转化子的基因组 DNA 进行完全酶切。杂交探针模板为 pTFCM 上 *hphB* 基因的部分片段。参照供应商提供的说明书(DIG high prime DNA labeling and detection starter kit I)进行 DNA 杂交试验。

1.5 转化子遗传稳定性的测定

选取部分灰葡萄孢转化子,活化后接种到不含潮霉素的 PDA 平板上,在温度 20 °C 条件下培养。连续转代 5 次后,打取各转化子菌落边缘菌丝块,分别移植到含有 50 μ g/mL 潮霉素的 PDA 平板上,在温度 20 °C 条件下培养,观察转化子的生长情况。

1.6 转化子生物学性状的观察

首先将野生型灰葡萄孢菌株 RoseBc-3 和转化子分别接种在 PDA 平板上,在温度 20 °C 条件下培养,观察其生长和产孢情况。然后测定菌株 RoseBc-3 和转化子的致病性。将菌株 RoseBc-3 和各转化子分别接种在 PDA 平板上,用直径 5 mm 的打孔器打取菌落边缘菌丝琼脂块,挑起菌丝琼脂块,逐一接种到新鲜的油菜叶片上,每个菌株接种 8 个菌丝琼脂块作为 8 次重复。将接种叶片置于 20 °C 条件下保湿培养 72 h,测量各接种菌丝琼脂块周围病斑直径。

1.7 T-DNA 侧翼序列的克隆和分析

采用反向 PCR 和 hi-TAIL PCR 方法分别克隆各类灰葡萄孢突变体代表菌株中 T-DNA 的侧翼序列。在反向 PCR 克隆中,根据质粒载体 pTFCM 上 *hphB* 基因的启动子 *Ptrpc* 的末端序列信息设计引物。首先参考宫晓燕的方法^[9]设计 1 条引物 *ptrpc*,其序列是 5'-ATGTCCTCGTT CCTGTCTGCTA-TA-3'。再根据载体上 T-DNA 左边界的序列信息反向设计 2 条巢式引物。用于第一轮 PCR 反应的引物 L1: 5'-AGGGTTCCTATAGGGTTTCGCT-CATG-3',第二轮 PCR 反应的引物 L2: 5'-CAT-GTGTGAGCATATAAGAAACCCT -3'。在 hi-TAIL-PCR 克隆中,所使用的 T-DNA 左右边界嵌套引物及 PCR 程序均参考 Liu 等的方法^[10]。

将 PCR 扩增得到的 DNA 条带测序,并对测出的序列信息进行分析。将侧翼序列与 GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和已经公布的灰葡萄孢的全基因组序列数据库(http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis_cinerea/)进行 Blast 比对,确定 T-DNA 在灰葡萄孢基因组中的插入位置,并推测插入位点附近的基因,或将这些基因序列在 GenBank 中进行 Blast 分析,以推测其可能的功能。

2 结果与分析

2.1 共培养温度对转化效率的影响

灰葡萄孢分生孢子萌发及菌丝生长的最适温度为 20 ℃,而农杆菌最适生长温度为 28 ℃。共培养试验结果表明,共培养温度对灰葡萄孢转化效率有影响。在 28 ℃ 共培养时没有灰葡萄孢转化子产生,在 22 ℃ 下共培养时产生的转化子最多(表 1)。

表 1 共培养温度和分生孢子浓度对转化效率的影响¹⁾

Table 1 Effect of co-culturing temperature and conidial concentration of *B. cinerea* on the transformation efficiency

孢子数量/(个/mL) Conidial number per mL	转化子数量/(个/皿) Number of transformants per dish		
	20 ℃	22 ℃	28 ℃
1×10^5	68 a	103 a	0 b
5×10^5	41 b	50 b	3 a
1×10^6	43 b	37 bc	3 a
5×10^6	0 c	0 c	0 b

1) 采用方差分析和最小显著差异法进行分析,同栏数字后字母相同者表示差异不显著($P > 0.05$)。Means within each column followed by the same letters indicate no significant difference according to least significant difference test($P > 0.05$)。

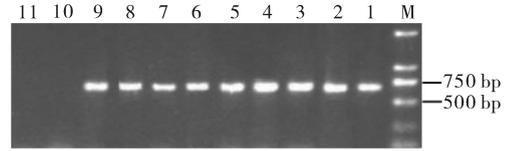
2.2 分生孢子浓度对转化效率的影响

试验结果表明,灰葡萄孢分生孢子浓度对转化效率有影响。当灰葡萄孢分生孢子浓度为 5×10^6 个/mL 时,在 3 种共培养温度下均未获得转化子(表 1)。随着灰葡萄孢分生孢子浓度的降低,转化子数量随之增加,当灰葡萄孢分生孢子浓度为 1×10^5 个/mL 时转化效率最高。在共培养温度为 20 ℃ 和 22 ℃ 下,平均每皿转化子数量分别达到 68 个和 103 个。

2.3 转化子的 PCR 鉴定与 DNA 杂交验证

随机选取 16 个灰葡萄孢转化子,分别提取其 DNA,用质粒 pTFCM 和野生型菌株 RoseBc-3 的 DNA 分别作为阳性和阴性对照,并用水作空白对照,用引物对 HYG-F/HYG-R 进行 PCR 扩增。结果表明,从所有转化子 DNA 中和质粒 pTFCM 均扩增出了 1 条大小约为 700 bp 的 DNA 片段,而从菌株 RoseBc-3 基因组 DNA 中没有扩增出该 DNA

片段(图 1),说明这些转化子中含有 T-DNA 序列。

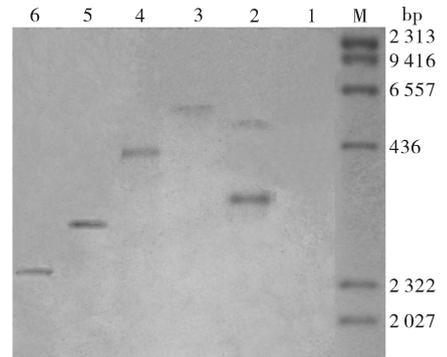


M. DNA 标记; 1~8. 转化子; 9. 质粒 pTFCM; 10. 对照; 11. 野生型菌株 RoseBc-3。M. DNA marker; 1-8. Transformants; 9. Vector pTFCM; 10. CK; 11. Wild type strain RoseBc-3.

图 1 灰葡萄孢菌株 RoseBc-3 转化子的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR identification of the transformants of *B. cinerea*

对其中的 8 个转化子进行了 DNA Southern 杂交试验。结果表明,从 7 个转化子中仅检测到 1 个杂交带,说明这些转化子为单拷贝插入(图 2 为部分转化子杂交结果)。从 1 个转化子中检测到 2 条杂交带,说明该菌株为双拷贝插入。据此推算,T-DNA 在灰葡萄孢菌株 RoseBc-3 中的单拷贝插入频率为 87.5%。



M. DNA 标记; 1. 野生型菌株 RoseBc-3; 2~6. 转化子。M. DNA marker; 1. Wild type strain RoseBc-3; 2-6. Transformants.

图 2 DNA 杂交结果

Fig.2 DNA southern blotting

2.4 转化子的遗传稳定性

随机选取 7 个灰葡萄孢转化子,在不含潮霉素的 PDA 培养基上连续转代 5 次后,再接种至含有潮霉素($50 \mu\text{g/mL}$)的 PDA 培养基上培养,结果显示所有转化子均能生长,说明转化子抗潮霉素质状能够稳定遗传。

2.5 灰葡萄孢 T-DNA 插入突变体

对 1 100 个灰葡萄孢转化子在 PDA 培养基上的培养性状(20 ℃)进行观察,并对其中 300 个转化子在油菜叶片上进行致病力测定,以筛选突变体。

试验结果获得了 6 类突变体：I. 产孢显著减少或不产孢突变体，这类转化子有 42 个，约占 3.8%；II. 生长速率减慢突变体有 38 个，约占 3.5%；III. 菌丝稀疏突变体有 18 个，约占 1.6%；IV. 菌落颜色异常突变体有 63 个，约占 5.7%；V. 致病力丧失突变体有 10 个，约占 3.3%；VI. 致病力增强突变体有 9 个，占 3.0%。

2.6 灰葡萄孢突变体 T-DNA 侧翼序列克隆和分析
本试验采用反向 PCR 技术对 4 个突变体中 T-

DNA 侧翼序列进行扩增，最后只从突变体 AT919 中获得了的 T-DNA 侧翼序列（表 2）。采用 hi-TAIL PCR 技术对 15 个突变体 T-DNA 侧翼序列进行扩增，获得了 13 个突变体菌株中 T-DNA 侧翼序列（表 1）。由表 1 可知，不同突变体菌株中 T-DNA 插入的位点不同，很多插入位点附近基因的功能尚不明确，并且 T-DNA 在基因编码区和非编码区插入的频度均为 7 次，说明 T-DNA 在基因编码区和非编码区插入是随机的。

表 2 几个致病力减弱和增强的灰葡萄孢突变体中获得的 T-DNA 侧翼序列¹⁾

Table 2 T-DNA flanking sequences in a few pathogenicity-decreased and pathogenicity-enhanced mutants of *Botrytis cinerea*

突变体 Mutant	致病力 Pathogenicity	插入位点或附近基因 T-DNA flanking gene	基因编号 Gene code	插入位置 T-DNA insertion site
AT19	-	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 β 亚基 Guanine nucleotide-binding protein beta subunit	BC1G_00943	非编码区 Non-coding region
AT39	-	丝裂原活化蛋白激酶激酶 I MAPKK I	BC1G_03809	编码区 Coding region
AT402	-	丝裂原活化蛋白激酶激酶 I MAPKK I	BC1G_03809	编码区 Coding region
AT319	-	延伸因子 3 Elongation factor 3	BC1G_15506	编码区 Coding region
AT332	-	细胞分裂周期蛋白 123 Cell division cycle protein 123	BC1G_10891	编码区 Coding region
AT919	-	琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基 Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	BC1G_07795	编码区 Coding region
AT11	-	羧酸酯酶类似假定蛋白 Hypothetical protein similar to carboxylesterase	BC1G_13737	非编码区 Non-coding region
AT411	+	泛素结合酶 E2 类似假定蛋白 Hypothetical protein similar to ubiquitin-conjugating enzyme E2	BC1G_07229	非编码区 Non-coding region
AT2	-	预测蛋白 Predicted protein	BC1G_11360	非编码区 Non-coding region
AT15	+	预测蛋白 Predicted protein	BC1G_00943	非编码区 Non-coding region
AT141	+	预测蛋白 Predicted protein/ 类似家族蛋白的假定蛋白 Hypothetical protein similar to family protein	BC1G_13800/ BC1G_13801	非编码区 Non-coding region/ 非编码区 Non-coding region
AT239	-	保守假定蛋白 Conversed hypothetical protein	BC1G_03701	非编码区 Non-coding region
AT426	-	预测蛋白 Predicted protein	BC1G_14158	编码区 Coding region
AT677	-	假定蛋白 Hypothetical protein	SS1G_12882	编码区 Coding region

1) “+”和“-”分别表示相对野生型菌株致病力显著增强和减弱(P=0.05)。

“+” and “-” indicate mutants with enhanced and decreased pathogenicity, respectively(P=0.05).

3 讨 论

影响根癌农杆菌介导真菌转化效率的因素很多，包括菌株类型、质粒载体、培养基种类、农杆菌与真菌共培养条件等，其中影响最大的因素是共培养

条件，如共培养时间、温度、农杆菌与受体的比例等^[11-14]。本试验对根癌农杆菌介导灰葡萄孢菌株 RoseBc-3 转化时的共培养温度和农杆菌与灰葡萄孢分生孢子比例两个方面进行了优化。结果表明，在共培养温度为 22 °C，农杆菌菌液中灰葡萄孢分生

孢子浓度为 1×10^5 个/mL 时,转化灰葡萄孢菌株 RoseBc-3 的效率最高,平均每皿转化子数量超过 100 个。Rolland 等^[5]报道,在进行 ATMT 转化灰葡萄孢时,农杆菌与灰葡萄孢共培养温度为 22 °C 时转化效率最高。共培养温度影响灰葡萄孢 ATMT 转化的具体原因可能是 20 °C 左右温度不利于农杆菌生长,而 28 °C 左右温度不利于灰葡萄孢生长,且高温可能不利于 T-DNA 的转移^[5],所以在 20 °C 和 28 °C 下共培养均不适宜于灰葡萄孢遗传转化。已有的研究表明,提高共培养体系中真菌孢子浓度有利于 ATMT 转化^[15-16]。但在本试验中,当灰葡萄孢分生孢子浓度为 5×10^6 个/mL 时,在 3 种共培养温度下均未获得转化子。这可能是由于灰葡萄孢分生孢子浓度过高、农杆菌数目相对较少、农杆菌与孢子的比例过低,从而使农杆菌细胞附着孢子的几率下降,产生的可转移 T-DNA 分子过少,最终导致转化失败。本试验在 22 °C 下将农杆菌与 1×10^5 个/mL 的灰葡萄孢进行共培养时,获得的转化效率远高于已有的研究结果^[5-6],且转化效率达到建立 T-DNA 插入突变体库的要求。

本试验对部分灰葡萄孢转化子进行了 PCR 鉴定及 Southern 杂交鉴定。结果表明,所得到的灰葡萄孢转化子中确实存在 T-DNA 插入,且单拷贝插入频率达到 87.5%。一般而言,高频率的单拷贝插入有利于 T-DNA 侧翼序列的克隆和基因功能分析。由此可见,本试验优化的根癌农杆菌介导转化灰葡萄孢的条件对后续分析灰葡萄孢基因功能是有利的。对转化子的表型和致病性的研究发现,转化子在生长速度、产孢量、菌落颜色及致病力等方面与野生型菌株 RoseBc-3 存在显著差异。对 T-DNA 侧翼序列的分析结果表明,T-DNA 在不同突变体中的插入位置和破坏的基因不同,说明 T-DNA 在插入到灰葡萄孢基因组中时具有随机性。随着突变体库的扩大,将得到大量 T-DNA 插入位点各不相同的突变体。

本试验结果获得了 G 蛋白 β 亚基基因、MAPKK1、延伸因子 Elongation factor 3 基因、Cell division cycle protein 123 基因、琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基基因以及其他一些假定蛋白基因(表 2)。其中有些基因的功能与已知的致病因子相关,如 G 蛋白 β 亚基基因与 G 蛋白介导的信号传导有关,被破坏后导致灰葡萄孢 RoseBc-3 致病力下降。MAPKK1 基因可能与灰葡萄孢 MAPKK 基因 *bos5* 具有相似

的功能,影响灰葡萄孢的致病力^[17]。其他一些基因的功能也可能与致病力相关,如延伸因子 EF3 基因具有依赖于核糖体的 GTPase 和 ATPase 活性,对于真菌的蛋白合成和存活至关重要^[18],缺失这一基因可能直接影响灰葡萄孢的生长。对于其他未知基因在灰葡萄孢致病过程中的作用有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] BUNDOCK P, DEN DULK-RAS A, BEIJERSBERGEN A, et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae* [J]. The EMBO Journal, 1995, 14(3): 3206-3214.
- [2] DEAN R, VAN KAN J A L, PRETORIUS Z A, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(4): 414-430.
- [3] CHOQUER M, FOURNIER E, KUNZ C, et al. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphagous pathogen [J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 277: 1-10.
- [4] AMSELEM J, CUOMO C A, VAN KAN J A L, et al. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* [J]. PLOS Genetics, 2011, 7(8): e1002230.
- [5] ROLLAND S, JOBIC C, FEVRE M, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences [J]. Current Genetics, 2003, 44(3): 164-171.
- [6] 冯娟, 朱廷恒, 崔志峰, 等. 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 [J]. 微生物学报, 2010, 50(2): 169-173.
- [7] 李模孝. 盾壳霉 T-DNA 标记插入突变体库的构建及其质量评估 [D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2005.
- [8] 吴发红, 黄东益, 黄小龙, 等. 几种真菌 DNA 提取方法的比较 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(8): 62-64.
- [9] 宫晓燕. 盾壳霉插入体库的构建及两个分生孢子形成相关基因的克隆 [D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2007.
- [10] LIU Y G, CHEN Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. Bio Techniques, 2007, 43: 649-656.
- [11] 张月婷, 廖玉才, 黄涛, 等. 农杆菌介导的小麦转化体系的优化 [J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(3): 246-350.
- [12] FIGUEIREDO J G, GOULIN E H, TANAKA F, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Gaillardia citricarpa* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 80: 143-147.
- [13] LIU T, LIU L X, JIANG X, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a useful tool for the molecular genetic study

of the phytopathogen *Curvularia lunata* [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 126(3): 363-371.

- [14] ZHENG Z L, HUANG C H, CAO L, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in medicinal fungus *Cordyceps militaris* [J]. *Fungal Biology*, 2011, 115: 265-274.
- [15] FLOWERS J L, VAILLANCOURT L J. Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola* [J]. *Current Genetics*, 2005, 48: 380-388.
- [16] COMBIER J, MELAYAH D, RAFFIER C, et al. *Agrobacteri-*

um tumefaciens-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 220: 141-148.

- [17] YAN L Y, YANG Q Q, SUNDIN G W, et al. The mitogen-activated protein kinase kinase BOS5 is involved in regulating vegetative differentiation and virulence in *Botrytis cinerea* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47: 753-760.
- [18] KAMATH A, CHAKRABURTTY K. Role of yeast elongation factor 3 in the elongation cycle [J]. *The Journal Biological Chemistry*, 1989, 264: 15423-15428.

***Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Botrytis cinerea* strain RoseBc-3**

FAN Lei ZHANG Jing YANG Long LI Guo-qing

College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In this paper, we reported results about characterization of the factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* strain RoseBc-3 and about the validity of ATMT for the particular strain of *B. cinerea*. The results showed that the temperatures for co-incubation of *A. tumefaciens* and *B. cinerea* and the conidial concentration of *B. cinerea* in the co-incubation mixture greatly affected the transformation efficiency. The optimal co-incubation temperature was 22 °C and the optimal conidial concentration was 1×10^5 conidia/mL. Under the optimal co-incubation conditions, the numbers of transformant reached 100 per dish (9 cm diameter). All the 16 randomly-selected transformants of *B. cinerea* were confirmed to harbor the T-DNA of *A. tumefaciens* based on the result of the specific PCR. The result of the Southern blotting further indicated the integration of the T-DNA in the genome of *B. cinerea* with the frequency of the single-copy insertion reaching 87.5%. Six types of mutants were identified from the transformants. They were sporulation deficiency mutants (3.8%), mycelial growth-reduced mutants (3.5%), sparse mycelia mutants (1.6%), colony color mutants (5.7%), pathogenicity decreasing mutants (3.3%) and pathogenicity enhancing mutants (3.0%). DNA sequences flanking the T-DNA tag were obtained using the inverse PCR technique and the hi-TAIL PCR technique from 14 mutants of *B. cinerea*. The insertion sites in these mutants were located with the same frequency in the coding region and in the non-coding regions.

Key words *Botrytis cinerea*; *Agrobacterium tumefaciens*; T-DNA; genetic transformation; mutants

(责任编辑:陈红叶)