

稻瘟病菌 T-DNA 插入方法优化及其突变体分析

李宏宇^{1,2,3} 潘初沂² 陈 涵¹ 赵长江² 鲁国东^{2*} 王宗华^{1,2*}

(¹ 福建农林大学生命科学学院; ² 福建农林大学植物保护学院, 福州 350002)

(³ 中国人民解放军军需大学, 长春 130062)

摘 要 优化了农杆菌介导转化稻瘟病菌获得 T-DNA 插入突变的条件, 包括选择转化子的潮霉素 B 用量, 抑制农杆菌的抗生素头孢噻肟钠和羧苄青霉素的配比, 不同转化阶段培养基的选择等。转化 1×10^6 个孢子平均可获得约 500 个左右的转化子, PCR 和 TAIL-PCR 检测表明约 85% 转化子中含 T-DNA 插入。对 1520 个突变体进行形态变异观察, 发现菌落颜色突变的有 15 个, 随机取 58 个突变体进行比较, 发现产孢量减少的 4 个, 孢子萌发率降低的 8 个, 附着胞形成率降低的 9 个, 还获得对水稻品种 CI01LAQ (Pi-1) 和 75-1-127 (Pi-9) 致病的突变体, 为进一步克隆相应的无毒基因奠定了基础。

关键词 稻瘟病菌, T-DNA, 插入突变, 功能基因组学

中图分类号 Q751 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0419-05

稻瘟病是由稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr.) 引起, 既是水稻最重要病害之一, 也是研究病原真菌和植物相互作用的模式病害系统^[1]。水稻基因组和稻瘟病菌基因组测序工作的进展^[2-4], 为进一步从基因组水平认识水稻与稻瘟病菌相互作用的机制奠定了基础。稻瘟病菌致病性复杂易变, 给水稻抗病育种及抗病品种的利用带来了极大困难。因此, 利用功能基因组学的方法从全基因组水平分析该菌的致病性变异机制非常必要。

基因插入失活获得能够覆盖全基因组的突变体库是功能基因组学研究的基础性工作。在真菌中最常用的插入失活方法是限制酶诱导整合 (Restriction enzyme-mediated integration, REMI)^[5], 但是 REMI 有许多缺点, 最大的缺点是所产生的转化子中约有 20% 高的可达到 80%, 其标签没有插入基因组中^[6], 这给进一步的突变体分析带来很多麻烦。近年新发展的农杆菌介导转化 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 的 T-DNA 插入方法解决了这一问题。ATMT 方法的优点: 一是转化材料易得, 可以用原生质体、菌丝、孢子和蘑菇的菌素等, 而 REMI 只能用原生质体进行转化; 二是得到

的转化子基因组中插入比例高, 而且多为单拷贝插入, 因而更有利于分离被标签的基因。目前, 应用 ATMT 法构建真菌突变体库已用于多种真菌^[7,8]。为此, 我们优化了 ATMT 方法的条件, 并获得一批稻瘟病菌 T-DNA 插入突变体, 包括形态发育和致病性突变体。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

稻瘟病菌菌株 6ZB15、95054B、81274 和测 86056 均为本实验室保存的从福建田间分离纯化的单孢菌系。

农杆菌菌株为 AGL-1。T-DNA 插入所用质粒为 pCAMBIA1300 中的 pCaMV35S-hph 被置换为 pTrpC-hpl (*Bam*H I / *Hind*III) 的 pBHt^[7], 由美国宾夕法尼亚州立大学的 Seogchan Kang 博士赠送。

1.2 培养基

酵母培养基: 淀粉 10g, 酵母粉 2g, 琼脂 10g, 加水至 1000mL。

米糠产孢培养基: 米糠 20g, 琼脂 18g, 加水至 1000 mL, pH6.5。

收稿日期 2003-01-28, 修回日期 2003-04-28。

基金项目 国家自然科学基金 (No. 30000111), 福建省“百千万”人才工程资助。

* 通讯作者: Tel 86-591-3789478, E-mail: guodonglu@yahoo.com, Tel 86-591-3779536, E-mail: wangzh@fjau.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

基本培养基:参见 Hooykaas 等^[9]的配方。

诱导培养基:参见 Mullins 等^[7]的配方。

共培养培养基:CM1 诱导培养基加 1.5% 琼脂,但加 2.5mL 2mol/L 葡萄糖;CM2, 诱导培养基加 1.5% 琼脂,但加 5mL 2mol/L 葡萄糖。

选择培养基:SM1, 基本培养基加 1.5% 琼脂;SM2 酵母培养基, SM3 米糠产孢培养基。

1.3 抗生素

选择转化子时用的潮霉素 B (Hygromycin B) 为德国 Roche 公司生产。采用液滴法测定不同潮霉素 B 浓度(0、200、400、600 和 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对稻瘟病菌孢子萌发的抑制效果。在玻片上滴 3 滴各 50 μL 的含潮霉素的孢悬液,放入含水的培养皿中 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养,培养 8、24、48、72 和 96h 后各观察 1 次,计算萌发率。同时,将稻瘟病菌分生孢子涂于含不同潮霉素 B 浓度的酵母培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2、3 和 4d 后观察菌落生长情况。以上实验每处理均设 3 次重复。

抑制农杆菌生长的头孢噻肟钠(Cefotaxime)和羧苄青霉素(Carbenicillin)分别为福建抗生素集团有限公司和美国 Amresco 公司生产。为观察头孢噻肟钠单用或与羧苄青霉素共用对稻瘟病菌与农杆菌共培养后农杆菌的抑制作用,在选择培养基上分别设头孢噻肟钠(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、头孢噻肟钠(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)加羧苄青霉素(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 2 个处理,选择出的稻瘟病菌转化子,在无抗生素的酵母培养基上培养,观察是否仍有农杆菌生长。

1.4 转化与筛选

转化方法参见 Mullins 等^[7]方法。

1.5 突变体中 T-DNA 插入的验证

根据 pBHt1 T-DNA 边界序列设计了一对扩增 T-DNA-trpC-hph-T-DNA 的引物, RB-S 5'CTGCGCAACT-GTTGGGAAGGGC3' 和 LB-AS 5'AGGGTTTCTTATATGCTCAACACCAT G 3'。

在 25 μL PCR 反应体系中,加稻瘟病菌 DNA1 μL , 10 \times 缓冲液 2.5 μL , 2.5mmol/L dNTP2.0 μL , 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 引物各 1.5 μL , 1.0U Taq DNA 多聚酶(TaKaRa 公司生产)循环条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2min, 循环 30 次; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8min。

同时,也用了 TAIL-PCR 扩增 T-DNA 侧翼序列, PCR 方法和引物 LB1-3 和 RB1-3 与 Mullins 等^[7]相同,但 AD 引物则选用在该菌中已证明有比较好的多态性的随机引物 OPJ-06, 序列为 TCGTTCGCCA^[10]。

1.6 表型观察

随机抽取 58 个突变体观察单孢分离物形态特征、生长发育过程,记录产孢量、附着胞形态和形成率,方法参见 Shi 等^[11]和 Lee & Dear^[12]。

1.7 致病性测定

将 1520 个突变菌株每 20 个一组混合接种于含单个抗瘟基因的水稻品种 C101LAC (Pi-1)、C101A51 (Pi-2) 和 75-1-12 (Pi-9) 及感病对照 CO39 上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 保湿 24h, 然后置于控温玻璃温室中让其发病, 8~10d 后调查病情, 参照 Bonman 等^[13] 0~5 级的标准记载病斑反应型。

2 结果与分析

2.1 转化条件的优化

2.1.1 抗生素的选用和优化: 将稻瘟病菌 4 个田间菌株 6ZB15、95054B、81274 和测 86056 的分生孢子置于不同浓度的潮霉素 B 水溶液中, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 并分别在 8、48、96h 观察其萌发情况。结果对照 8h 内, 分生孢子萌发率就已达 90%; 但在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 水溶液中, 只有 1% 萌发; 而在 400、600 和 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 中, 孢子都没有萌发。对潮霉素 B 水溶液中的分生孢子培养 48h 和 96h 后, 进一步观察的结果表明经 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理的分生孢子萌发率略有增加, 分别是 2% 和 5%, 400、600、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 中仍然未见孢子萌发, 菌株间没有差异。可见 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 水溶液对稻瘟病菌分生孢子萌发有较好的抑制效果。

而将上述 4 个菌株的分生孢子均匀地铺于含不同浓度潮霉素 B 的培养基平板上, 结果是 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2d 后在对照中就可以观察到菌落, 其余则未见; 3d 后对照菌落已基本长满平板, 所有菌株均可在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 平板上见到少量菌落生长, 而且菌株 95054B 在 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 平板上仍可见少量菌落生长; 4d 后所有菌株在 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 平板上均有菌落生长, 菌株 95054B 在 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 平板上也可见少量菌落生长。结果表明, 在平板培养基上, 需要较高浓度的潮霉素 B 才能达到较好的抑菌效果, 而且不同稻瘟病菌菌株间所需的抑菌浓度也有差异。因此, 在进行转化选择时必须根据所用菌株确定潮霉素 B 的用量, 而且要尽早将转化子转移到新的培养基上, 以免出现太高比例的假转化子。

稻瘟病菌与农杆菌共培养后, 选用合适的抗生素抑制农杆菌的生长极为重要。结果表明, 在稻瘟病菌与农杆菌共培养后, 从只用头孢噻肟钠(200

$\mu\text{g}/\text{mL}$) 的选择培养基上分离纯化的稻瘟病菌株中, 约有 80% 在培养时仍可见农杆菌生长, 而在含头孢噻肟钠 ($200\mu\text{g}/\text{mL}$) 和羧苄青霉素 ($200\mu\text{g}/\text{mL}$) 的选择培养基上分离纯化的稻瘟病菌株中, 只有 8% 在继代培养时仍可见农杆菌生长, 但在选择培养基上培养时间延长, 带农杆菌的比例还会增加。因此, 在选择培养基中, 应同时加入头孢噻肟钠 ($200\mu\text{g}/\text{mL}$) 和羧苄青霉素 ($200\mu\text{g}/\text{mL}$) 以有效抑制农杆菌的生长。

2.1.2 培养基的优化 2 种共培养培养基比较结果表明, CM1(培养基中葡萄糖含量为 $5\text{ mmol}/\text{L}$) 的共培养效果好, 共培养 36h 在硝酸纤维素膜上可见稻瘟病菌菌丝生长, 但又不过于茂盛, 结果能得到较多的转化子; 而在 CM2(培养基中葡萄糖含量提高到 $10\text{ mmol}/\text{L}$) 共培养 36h 看不到稻瘟病菌菌丝, 最后在选择培养基上也得不到转化子, 这可能是由于葡萄糖含量高不利于稻瘟病菌生长。

2 种选择培养基比较结果表明, 共培养后的稻瘟病菌在 SM1(基本培养基)、SM2(酵母培养基) 和 SM3(米糠产孢培养基) 上均能良好生长, 说明 ATMT 方法在选择转化子时, 对培养基要求不严。米糠产孢培养基不易污染, 而且可以直接产孢, 是比较适宜的培养基。

2.2 转化子 T-DNA 插入的 PCR 验证及其插入的稳定性

随机抽取获得的转化子, 以 T-DNA 左右边界序列设计的引物进行 PCR, 结果从转化子 1-1t-8、1-1t-5、1-Pi9-14、1-Pi9-12、1-Pi9-9、1-Pi9-8、1-Pi9-4 都扩增到一条约 1.5 kb 大小的片段, 野生型菌株对照和清水中均未见该条带, 但 Pi9-13 也没有条带(图 1), 可能没有 T-DNA 插入, 或是 T-DNA 边界序列丢失。多次转化结果平均每 1×10^6 个孢子可以得到约 500 个转化子, 而 PCR 结果则表明其中约有 15% 的转化子中不含 T-DNA 插入。因此, 转化 1×10^6 个孢子可获得近 450 个含 T-DNA 插入的转化子。

用一批 T-DNA 插入突变体在无潮霉素的产孢培养基上产孢, 然后在无潮霉素的酵母培养基上转接 5 代, 最后转至含 $400\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素的活化培养基上, 而这些插入突变体仍能生长, T-DNA 插入片段仍然存在。说明通过农杆菌介导转化方法获得的突变体是稳定的。

进一步用 TAIL-PCR 扩增这些转化子的 T-DNA 侧翼边界序列, 结果表明上述有 T-DNA 插入的转化子中均能扩增出特异的片段(图 2, 第 2-17 和第 20-21 列), 而无 T-DNA 插入的转化子(图 2, 第 18-19 和

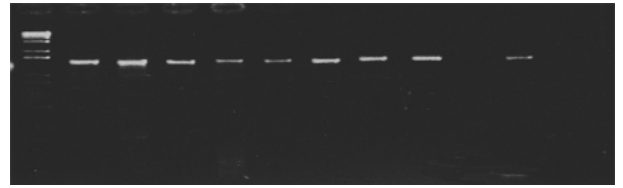


图 1 稻瘟病菌转化子 T-DNA PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplified T-DNA inserts from transformants of *Magnaporthe grisea*. From left to right, 1kb plus DNA ladder (Invitrogen, US), 1-Pi9-8, 1-1T-5, 1-00530, 1-00528, 1-00527, 1-00526, 1-00441, 1-00109, 1-00057, 1-00054, 6ZB1 Δ wild type).

野生型对照(图 2, 第 22-23)却只能扩增到非特异序列。对 TAIL-PCR 特异产物测序表明它们均是稻瘟病菌基因组序列(结果未给出)。

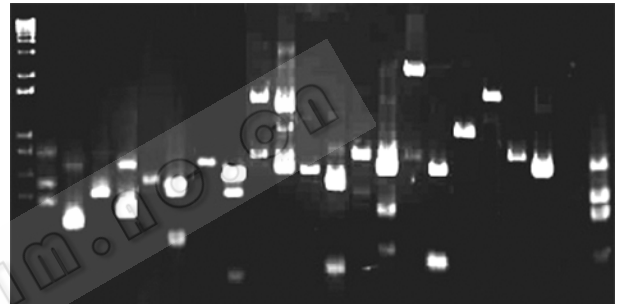


图 2 稻瘟病菌转化子 TAIL-PCR 扩增结果

Fig. 2 TAIL-PCR agarose gel pattern from transformants of *Magnaporthe grisea*. Amplification of transformants was performed with the left border(LB) set of primers (LB-1, 2, and LB-3) and arbitrary primer (OPJ-06). The primary amplification result was not shown. The left first lane is 1kb plus DNA ladder (Invitrogen, US), then every two lanes are secondary and tertiary amplification pattern of transformants 1-Pi9-8, 1-1T-5, 1-00530, 1-00528, 1-00527, 1-00526, 1-00441, 1-00109, 1-00057, 1-00054 and 6ZB1 Δ wild type).

2.3 T-DNA 插入突变体生长发育和致病性变异观察

对 1520 个 T-DNA 插入突变体形态发育进行观察, 结果发现菌落白色突变株 4 个, 菌落黄色突变株 5 个, 还有些黑色素减少的, 菌落颜色变为灰白或灰黑的。随机抽取 58 个突变体观察, 其中产孢减少的有 5 个突变体, 占 8.6%, 孢子萌发率减少的有 8 个, 占 13.8%, 附着胞形成率减低的有 9 个, 占 15.6%。其中, 突变体 1-00230 孢子不能萌发, 突变体 1-00358、1-00449、1-00162 的附着胞形成率不到 10%, T-DNA 插入的 PCR 验证这些有明显表型的突变体均有 T-DNA 插入(表 1)。

表 1 稻瘟病菌部分 T-DNA 插入突变体的生长与发育变化

Table 1 Developmental defect of T-DNA insertional mutants of *Magnaporthe grisea*

Isolate	Sporulation ($\times 10^5$ spores/cm ²)	Spore germination/%	Appressorium formation/%	T-DNA insertion
6ZB15 ⁺	3.16	99	83.3	N ^{**}
1-00230	2.52	0 ⁺⁺⁺	0 [*]	Y
1-00170	2.02	17 ⁺⁺⁺	14 [*]	Y
1-00043	1.07 ⁺⁺	86	76.5	Y
1-00342	2.52	26.7 ⁺⁺⁺	15.7 [*]	Y
1-00232	1.26 ⁺⁺	98	88.7	Y
1-00208	1.20 ⁺⁺	80.5	66.4	Y
1-00028	0.95 ⁺⁺	93.3	66.7	Y
1-00204	0.57 ⁺⁺	59.0	17.4 [*]	Y
1-00162	3.41	8.9 ⁺⁺⁺	6.6 [*]	Y
1-00354	3.09	23.9 ⁺⁺⁺	18.7 [*]	Y
1-00449	6.32	5.3 ⁺⁺⁺	4.6 [*]	Y
1-00305	5.12	16 ⁺⁺⁺	12.3 [*]	Y
1-00358	6.00	14.5 ⁺⁺⁺	9.9 [*]	Y

⁺ Wild type control; ⁺⁺ Sporulation decreased mutants; ⁺⁺⁺ Low spore germination mutants; ^{*} Appressorium defective mutants; ^{**} N, no T-DNA insertion; Y, with T-DNA insertion.



图 3 T-DNA 插入获得稻瘟病菌致病性突变体

Fig.3 Pathogenicity mutation of T-DNA insertional mutants of *M. grisea*

a) 1 ~ 3. Avirulent wild type Ce86056 and its virulent mutants 1t-1 and 1t-8 on rice variety C101LAC (Pi-1); b) 1 ~ 4. avirulent wild type 6ZB15 and its virulent mutants Pi9-4, Pi9-8 and Pi9-9 on rice variety 75-1-127 (Pi-9)

为了快速定向筛选无毒基因发生变异的转化子,我们将每 20 个转化子产孢后混合接种于含单个抗瘟基因的水稻品种 C101LAC (Pi-1) 和 C101A51 (Pi-2) 和 75-1-127 (Pi-9) 及感病对照 CO39 上。结果在 C101LAC (Pi-1) 上有 2 个接种组合发病(图 2a, 2-3 叶),从感病型病斑中分离单孢,接种验证,仍能致病。在 75-1-127 (Pi-9) 上有 1 个接种组合发病(图 2b, 2-4 叶),从感病型病斑中分离单孢,再接种也验证了

其致病特征。提取这些突变体的 DNA,以 T-DNA 边界序列为引物用 PCR 方法扩增,证实了它们均有 T-DNA 插入。这说明已获得对水稻品种 C101LAC (Pi-1) 和 75-1-127 (Pi-9) 能致病的 T-DNA 插入突变体。

3 讨 论

研究表明不同稻瘟病菌菌株间对潮霉素 B 的敏感程度不同。因此,在今后的研究中应针对所用菌株进行浓度梯度筛选,确定适合的潮霉素 B 用量。头孢噻肟钠属于 β -半乳糖苷酶抑制型抗生素,能抑制肽聚糖链的交联,而羧苄青霉素能抑制肽聚糖的生物合成,所以两者同时使用效果会更好。

由于 T-DNA 插入方法比 REMI 方法有诸多优势,加之真菌多为单倍体的遗传特点,突变体无需纯合的过程,其性状就可以表现出来,因此,可望会有更多利用 ATMT 法获得突变体并对目的基因功能分析的研究。本研究所用载体是通过插入抗生素选择标记导致基因失活的,今后应当将一些报告基因直接插入,这样就可以更容易选择真正的转化子,而且可以直观地研究特定基因在生长发育过程的作用。同时,仍应结合其它方法,以免单一方法的非随机性插入。此外,今后还应构建激活型载体,以使被插入的基因表达加强。突变体库构建的关键是要有足够的库容量,以覆盖全基因组。根据稻瘟病菌基因组特点,估计其约含 11109 个基因(<http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe>)。如果覆盖基因组 3 倍,必须构建 3 ~ 4 万个突变体,这需要很大的人力和物力。因此,我们目前采取的办法是对批量突变体进行定向筛选,如混合接种对致病性突变体进行快速筛选,一旦得到突变体,就可以对 T-DNA 侧翼边界序列进行扩增和测序,然后进行 Blast、基因克隆和功能分析。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Valent B. Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology*, 1990, **80**: 33 - 36
- [2] Yu J, Hu S, Wang J *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 2002, **296**(5565): 79 - 92
- [3] Goff S A, Ricke D, Lan T H *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 2002, **296**(5565): 92 - 100
- [4] [Http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe](http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe)
- [5] LIU S (刘树俊), WEI R X (魏荣萱), Arie T (有江力) *et al.* REMI mutagenesis and identification of pathogenic mutants in *Magnaporthe grisea*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1998, **14**: 254 - 258

- tal mutants of *Glomerella graminicola* (*Collectorichum graminicola*). *Fungal Genet Biol* ,1998 **23** :189 – 203
- [7] Mullins E D ,Chen P X , Romaine P *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum* : An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* ,2001 **91** :173 – 180
- [8] FANG W (方卫国) ,ZHANG Y (张永军) ,YANG X Y(杨星勇) *et al.* Transformation in fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Chinese Biotechnology* (中国生物工程杂志) , 2002 **22** (5) :40 – 44
- [9] Bernardo M A , Naqvi N , Leung H *et al.* A rapid method for DNA finger printing of the rice blast fungus *Pyricularia grisea*. *International Rice Research Notes* .1993 **18** (1) :48 – 50
- [10] Hooykaas P J J ,Roobol C ,and Schiperoort R A. Regulation of the transfer of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Gen Microbiol* , 1979 **110** 99 – 109
- [11] Shi Z X and Leung H. Genetic analysis of sporulation in *Magnaporthe grisea* by chemical and insertional mutagenesis. *Mol Plant-Microbe Interact* ,1995 **8** 949 – 959
- [12] Lee Y H and Dean R A. cAMP regulates infection structure formation in plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* ,1993 **5** : 693 – 700
- [13] Bonman J M , Vergel de Dios T I , Khin ,M M. Physiologic specialization of *Pyricularia oryzae* in the Philippines. *Plant Dis* ,1986 **70** : 767 – 769

Optimization of T-DNA Insertional Mutagenesis and Analysis of Mutants of *Magnaporthe grisea*

LI Hong-Yu^{1 2 3} PAN Chu-Yi² CHEN Han¹ ZHAO Chang-Jiang² LU Guo-Dong^{2*} WANG Zong-Hua^{1 2*}

(¹ School of Life Sciences ; ² College of Plant Protection , Fujian Agriculture and Forestry University , Fuzhou 350002 ,China)

(³ Department of Agroculture-side Production ,Quartermaster University of PLA ,Changchun 130062 ,China)

Abstract The rice blast fungus *Magnaporthe grisea* causes one of the most destructive diseases of rice around the world. Significant progresses have been made recently in genomics studies of the fungus , opening new era of the functional genomics which requires to generate a large scale of gene knockout mutants. It has been demonstrated that T-DNA insertional mutagenesis is a powerful tool of functional genomics not only for plants but also for fungi. In this paper , we optimized the conditions for T-DNA insertional mutagenesis of *M. grisea* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation(ATMT) approach. We employed the binary vector pBHt1 constructed by Dr. S. Kang 's laboratory at the Pennsylvania State University , which carries the bacterial hygromycin B phosphotransferase gene(*hph*) under the control of the *Aspergillus nidulans trpC* promoter as a selectable marker to transform the conidia of *M. grisea*. We optimized the conditions for T-DNA insertional mutagenesis including the medium , dosage of hygromycin B , cefotaxime and carbenicillin to select the transformants and inhibit the growth of *A. tumefaciens* after co-culturing. The dosage to inhibit non-transformants could vary from 200-600 μ g/mL among different *M. grisea* isolates so that the optimal dosage of the antibiotics should be decided according to isolates. Rice polished agar medium was found the best selection medium which would facilitate the mutant sporulation and minimize the contamination chance. In average , about 500 transformants could be obtained when transforming 1×10^6 spores at the optimum condition , among which 85% had T-DNA insertion detected by polymerase chain reaction(PCR) and thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction(TAIL-PCR). Fifteen out of 1520 transformants showed mutation in colony morphology. Within 58 randomly selected mutants , it was found that there were 4 sporulation-decreased mutants , 8 less germination mutants and 9 appressorium defective mutants. Several virulent mutants to C101LAC(Pi-1) and 75-1-127(Pi-9) were also obtained which would facilitate cloning the corresponding avirulence genes.

Key words *Maganaporthe grisea* , T-DNA , insertional mutagenesis , functional genomics

Received : 01-28-2003

This work was supported by Grant from Natural Science Foundation of China to(No. 30000111) and Grant for Bai-Qian-Wan Future Prosperous Scientists in Fujian Province

* Corresponding authors : Tel 86-591-3779536 , Fax 86-591-3789478 ; E-mail guodongfu@yahoo.com , wangzh@fjau.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn