稻瘟病菌新无毒基因 *AvrPi7* 的遗传及物理作图

冯淑杰 王 玲 马俊红 林 菲 潘庆华 *

(华南农业大学资源环境学院植物抗病遗传学研究室, 广州 510642; 华南农业大学园艺学院植保教研室, 广州 510642. * 联系人, E-mail: panqh@scau.edu.cn)

摘要 稻瘟病是目前最具毁灭性的作物病害之一. 本研究通过由田间菌株CHL346 和CHL42 杂交得到的 189 个子囊孢子菌株构建的分离群体, 在亲本菌株CHL346 中鉴定到了与水稻稻瘟病抗性基因*Pi7* 对应的无毒基因*AvrPi7*. 为了确定*AvrPi7* 位点的染色体位置, 本研究开发了一套基于稻瘟病菌测序菌株 70-15 全基因组序列的 121 个微卫星(simple sequence repeat, SSR)标记. 利用这些SSR标记对*AvrPi7* 位点进行了连锁分析. 结果表明, 位于第 1 染色体的 8 个SSR标记与该无毒基因连锁, 其中 2 个最近的侧翼标记MS1-9 和MS1-15 分别距离*AvrPi7* 位点 3.2 和 16.4 cM. 为了进一步完成该位点的精细作图, 在MS1-9 和MS1-15 的侧翼区域进一步开发了 8 个SSR标记和 3 个候选无毒基因(candidate avirulence gene, CAG)标记. 通过对这些标记的连锁分析, *AvrPi7* 位点被界定于标记MS1-21 和MS1-22 之间 1.6 cM 的区域内, 并与标记CAG2 共分离. 为了构建该无毒位点的物理图谱, 通过生物信息学分析(bioinformation analysis, BIA), 将与该基因连锁的分子标记分别着陆于参考菌株 70-15 的超重叠群(supcontig)上. *AvrPi7* 位点最终被界定在标记MS1-21 和MS1-22 之间的 75 kb 区段内. 本研究的结果对于进一步了解真菌中普遍存在的重组不平衡和部分二倍体等现象, 以及对该基因进行克隆及其功能研究具有重要意义.

关键词 *Magnaporthe oryzae* 无毒基因 高分辨率图谱 部分二倍体

由丝状子囊真菌稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*; 无性态, *Pyricularia oryzae*)引起的稻瘟病是世界范围内最具毁灭性的病害之一^[1]. 目前, 人们一般是通过利用抗病品种和使用杀菌剂来控制该病害的^[2]. 无疑地, 利用抗病品种是减少杀菌剂的使用、减少产量损失的最经济有效且对环境安全的策略. 然而, 由于田间新的致病性小种的出现或是病原菌群体中毒性小种组分的改变, 新培育出的抗病品种通常在使用几年后就会“丧失”抗性, 变为感病品种^[3]. 因此, 要培育和利用具有持久抗性的水稻品种势必要求对稻瘟病菌的致病性变异有着更加清楚的了解.

稻瘟病系统是典型的“基因对基因”(gene-for-gene)系统. 在这个系统中, 病原菌的无毒基因(*Avr*)与水稻中相应的抗病基因(*R*)特异性地互作^[4]. 水稻的抗病性依赖于与其相对应的稻瘟病菌*Avr*基因结合物的存在. 因此, 对*Avr*基因遗传和分子机制的研究对理解病原菌如何克服寄主植物的抗性是必需的.

在稻瘟病菌的早期研究中, 由于杂交过程中有性态的缺乏, 该病原菌的遗传分析受到了极大的阻

碍. 直到 20 世纪 70 年代, Hebert^[5]首次离体培养出分离自血马唐的稻瘟病菌有性态, 并证明了这种真菌是异宗配合的. 之后, 许多研究者对分离自水稻的稻瘟病菌菌株的育性进行了大量的研究, 这些菌株主要来自日本、美国、法国和中国^[6]. 然而, 由于这些来自水稻的稻瘟病菌菌株育性都比较低, 且在杂交中通常都表现为雄性, 因此, 仅鉴定到了几个*Avr*基因^[6,7].

一个对水稻致病的两性菌株Guy11 的鉴定和利用使水稻稻瘟病菌菌株之间的杂交成为可能. Leung 等人^[8]利用Guy11 和实验室菌株 2359 的杂交组合鉴定到了*POS1* (pathogenicity on *Oryza sativa*)和*POS2*; 利用Guy11 和分离自水稻的田间菌株CH104-3 的杂交组合鉴定到了*POS3* 和*POS4*. Leong及其同事^[9,10]利用Guy11 和分离自水稻的改良菌株 2359 的杂交组合鉴定到了*avrCO39*(后来改为*AVR1-CO39*). Lau 等人^[11]利用Guy11 和分离自水稻的改良菌株 66.10 的杂交组合鉴定到了*P11* 和*P12*. 通过分离分析, Silue 等人^[12]利用Guy11 和分离自水稻的改良菌株ML25 的杂交组

2006-10-28 收稿, 2007-01-21 接受

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2006CB100206)、教育部长江学者和创新团队发展计划(批准号: IRT0448)和广东省自然科学基金(批准号: 021006, 039254)资助项目

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2007-52-3-283>

合鉴定到了 *Avr1-PiNp4*; 利用 Guy11 和另一个菌株 2/0/3 的杂交组合鉴定到了 *AVR1-CIC6*, *AVR1-Ku86* 和 *AVR1-IRT7* (后来改为 *ACE1*), 其中菌株 2/0/3 是 Guy11 和 ML25 的杂交产生的后代。后来, Diod 等人^[13] 利用限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 和随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记将 *Avr1-IRT7*, *Avr1-Ku86* 和 *Avr1-MedNoi* 定位在相应的染色体上。王宝华等人^[14] 利用 Guy11 和采自福建省的菌株 81278ZB15 的杂交组合鉴定到了 *Avr-Pi1*, *Avr-Pi2* 和 *Avr-Pi4a*。

随着 Guy11 的鉴定, 在中国也相继鉴定到几个具有高育性的两性菌株^[13,15-17]。通过这些田间菌株, 先后鉴定了一些 *Avr* 基因。Valent 及其同事^[18,19] 利用中国的水稻田间菌株 O-135 和对弯叶画眉草致病的菌株 4091-5-8 的杂交组合鉴定到了 *AVR1-CO39*, *AVR1-M201* 和 *AVR1-YAMO*; 利用菌株 4224-7-8 和 6043 的杂交组合鉴定了 *Avr2-YAMO* (后来改为 *AVR-Pita*), *AVR1-MARA*, *AVR1-TSUY* 和 *AVR1-MINE*, 其中菌株 4224-7-8 是对水稻致病的实验室菌株, 而菌株 6043 是来自 O-135 和 Guy11 杂交的改良菌株。Yasuda 等人^[20,21] 利用田间菌株 Y90-71 和实验室菌株 3514-R-2 的杂交组合鉴定到了 *Avr-Hattan3*, 利用另一个由田间菌株 Y93-164a-1 和 Y93-165g-1 的杂交组合鉴定了 *Avr-Pia*, *Avr-Pii* 和 *Avr-Pit*。李成云等人^[15] 利用田间菌株 94-84c 和 95-23-4a 的杂交组合鉴定了 *Avr-Xiu*。刘俊峰等人^[22] 利用水稻田间菌株 S159 和 S1522 的杂交组合鉴定到了 *Avr-Pik^m*。林菲等人^[16] 利用水稻田间菌株 CHL124 和 CHL125 的杂交组合鉴定了 *Avr2-Pish* 和 *Avr2-Pit*。Luo 等人^[3] 利用水稻田间菌株 84R-62B 和 Y93-245C-2 的杂交组合鉴定了 *AvrPik*, *AvrPiz* 和 *AvrPiz-t*。迄今为止, 已经鉴定了 40 多个无毒基因, 然而, 仅有 3 个具有品种专化性的无毒基因, 即 *AVR1-CO39*^[9], *AVR-Pita*^[23] 和 *ACE1*^[24] 被克隆。

无毒基因的克隆大多是利用图位克隆的方法来完成的^[25]。这种方法必须构建目标基因位点高分辨率的遗传及物理图谱。然而, 高分辨率图谱构建的成功与否取决于能否获得与目标基因紧密连锁的分子标记, 因为这些标记主要用于提高遗传图谱的密度、组装物理图谱中的重叠群以及染色体步移到目标位点。由国际水稻稻瘟病基因组计划 (International Rice Blast Genome Project, IRBGP; <http://www.fungal.ge->

[nomics.ncsu.edu](http://www.fungal.ge-nomics.ncsu.edu); <http://www.genome.wi.mit.edu>) 公布的参考菌株 70-15 的全基因组序列为开发各种标记提供了足够的信息。虽然稻瘟病菌的不同菌株之间存在丰富的序列多样性, 然而由于同一物种的不同菌株之间基因组序列存在着同线性和高度的保守性, 因此, 利用参考菌株的序列信息来克隆其他菌株的相关基因的策略也是可行的。

本研究利用 2 个田间菌株 CHL346 和 CHL42 杂交产生的后代群体分析了稻瘟病菌的一个新无毒基因 *AvrPi7* 的遗传模式; 根据参考序列开发了物理位置特异性的标记, 并利用这些标记将该 *Avr* 基因精细作图位于第 1 染色体上 1.6 cM 的遗传区域内, 其物理区域约为 75 kb。

1 材料与方法

() 遗传杂交、子囊孢子菌株的产生和菌丝体 DNA 的提取。亲本菌株 CHL346 (*MAT1-1*, 雄性) 和 CHL42 (*MAT1-2*, 两性) 分别采集自江苏省和云南省田间发病的水稻植株, 通过单孢分离得到。遗传杂交和子囊孢子菌株的产生按照文献^[26]所述方法进行。后代菌株的长期保存按以下步骤进行: 两块菌丝块接到铺有灭菌滤纸的米糠培养基 (rice polish agar medium, RPA, 20 g 米糠, 2 g 酵母粉, 11 g 琼脂粉, 1 L 蒸馏水) 平板上^[27], 26 °C 培养 10 d。将长满菌丝的滤纸取出, 放入灭菌的空培养皿中, 真空干燥 3 周。最后, 将干燥好的滤纸剪成小片 (大约 0.25 mm²), -20 °C 保存。亲本及后代菌株菌丝的培养和 DNA 抽提按以前的描述进行^[26]。

() 植物材料、接种和病害调查。携带 *R* 基因 *Pi7* 的单基因系 IRBL7-M^[28] 和感病对照品种 Sariceltik 以及其他 66 个具有不同抗性基因型的品种 (数据未列出) 用于本研究中。秧苗的培育和接种物的制备按文献^[27]的方法进行。接种 6 d 后, 根据文献^[29]描述的 6-级标准进行病害调查。根据数据分析, 如果一个菌株在寄主品种上引起的病斑是 3~5 级的, 则认为这个菌株是毒性的; 相反, 如果病斑表现为 0~2 级, 则认为这个菌株是无毒性的。每个菌株至少测试 2 次。后代群体中无毒性的分离比通过 χ^2 检验来验证无毒性 (avirulent, A)/毒性 (virulent, V) 是否符合 1A : 1V 或 3A : 1V 的比率。对于单倍体的病原菌来讲, 如果无毒性/毒性符合 1 : 1 的分离比, 说明该亲

本菌株在携带相应抗病基因的品种中表现的无毒性是由单基因控制的;若是 3:1 的比率,则说明该亲本菌株的无毒性是由 2 个基因控制的.

() 标记的开发和 *Avr* 基因位点的遗传作图. 为了快速定位目标基因,我们基于 IRBGP 公布的参考菌株 70-15 的序列信息开发了简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 和候选无毒基因 (candidate avirulence gene, CAG) 标记. 在第 1 轮连锁分析中,为了定位目标基因,通过生物信息学分析法 (bioinformatics analysis, BIA),并根据稻瘟病菌的全基因组序列,开发了均匀地分布于稻瘟病菌全基因组 7 条染色体的 SSR 标记 [26]. 在第 2 轮连锁分析中,为了缩小含有目标基因的染色体区域,在第一轮 SSR 标记界定的区域内开发另外的一些 SSR 标记;在第 3 轮连锁分析中,为了对 *AVR1-CO39* 位点和 *AvrPi7* 位点进行分子等位性测定,根据 *AVR1-CO39* 等位基因的序列开发了 ASP 标记 (allele specific polymorphic, 等位基因

特异性扩增多态性), *ASP-CO39* [30], 最后,为了完成 *Avr* 基因的精细定位,根据基因注释系统 Softberry FGENESH (<http://www.softberry.com>) 预测到的候选基因的序列开发了相应的 CAG 标记. 所有设计好的引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成. 本研究用到的多态性标记的引物序列、物理位置、PCR 扩增条件以及产物的检测均在表 1 中列出.

根据致病性测定的结果,分别选取对供水稻品系 IRBL7-M 表现为无毒性或毒性的菌株各 8 个,提取各菌株 DNA 后,调整其浓度,然后将其等量混合,构建无毒性菌株池 (A pool) 或毒性菌株池 (V pool). 目标基因的定位按照文献 [26,31~33] 的方法进行. 因为稻瘟病菌是单倍体的病原菌,因此重组率计算可以简单地按照以下公式计算: $r = N_r / N_T$, 其中, N_r 是重组体的数目, N_T 是整个作图群体的数目. 按文献 [27] 所述方法完成重组率和厘摩 (centimorgan, cM) 之间的转换.

表 1 本研究中使用多态性微卫星标记 (SSR)、等位基因特异性扩增多态性标记 (ASP) 和候选无毒基因标记 (CAG)							
标记	引物 (5' 3') ^{a)}	标记类型	SSR 基序 ^{b)}	超重叠群 ^{c)}	PCR ^{d)}	凝胶 ^{e)}	预期长度/bp
MS1-3	gctgtccaaccctcactgct (F) gttggtcgacaccccttg (R)	SSR	(CA/GT) ₂₅	2	A		295
MS1-5	tcgtagagtagttccagtc (F) cgctcgaggatagtcgtgtt (R)	SSR	(TA/AT) ₂₂	2	A		185
MS1-6	gactcccatagcgggtgttg (F) caagacccacacacccag (R)	SSR	(CAG/GTC) ₁₁	2	B		177
MS1-7	cagtgccttggttctggag (F) ctaacctcccctgctctet (R)	SSR	(TG/AC) ₂₀	2	A		259
MS1-8	ttagaccgtcatgccatcag (F) caacggaaatggtgaggtat (R)	SSR	(CT/GA) ₁₈	13	B		229
MS1-9	ccaagaaccaagtcaccc (F) gactcctgtgttgattgcgg (R)	SSR	(AC/TG) ₁₉	13	A		256
MS1-13	tgggtgaagcacgacggaat (F) gcttggtgctctcccgactc (R)	SSR	(CT/GA) ₁₁	16	A		224
MS1-15	caggcaagactatggcaagg (F) ctggactgctgggtggttc (R)	SSR	(CA/GT) ₂₄	17	B		240
MS1-21	ggtcgcgtcagtgactaac (F) gagaaccgcatggctgagag (R)	SSR	(TAC/ATG) ₉	17	C		334
MS1-22	gtcatgtgttgagccctagcc (F) cgtttgagccaggaggagtc (R)	SSR	(CA/GT) ₁₁	13	C		324
MS1-25	cggtagctccgctccaatag (F) cccagggtagtaatacaacgg (R)	SSR	(TAGG/ATCC) ₁₈	17	C		288
CAG2	ggaattgttgaaggccgtag (F) gtaggagattacagcagcgag (R)	CAG	—	17	D		1100
ASP-CO39	aactgcgtgagctacc (F) aatagactagcttcctg (R)	ASP	—	1534	E		1200

a) F, 正向; R, 反向. b) SSR 基序及其互补序列, 以及在参考序列的重叠群中出现重复的次数. c) 超重叠群编号 (<http://www.riceblast.org>). d) A: 94 预变性 4 min; 94 , 30 s, 60 , 45 s, 72 , 1 min, 30 个循环; 72 延伸 7 min; B: 94 预变性 4 min; 94 , 30 s, 56 , 45 s, 72 , 1 min, 30 个循环; 72 延伸 7 min; C: 94 预变性 4 min; 94 , 30 s, 62 , 45 s, 72 , 1 min, 30 个循环; 72 延伸 7 min; D: 94 预变性 4 min; 94 , 30 s, 64 , 45 s, 72 , 1 min, 30 个循环; 72 延伸 7 min; E: 94 预变性 4 min; 94 , 30 s, 52 , 45 s, 72 , 1 min, 30 个循环; 72 延伸 7 min. e) , 6%聚丙烯酰胺凝胶; , 3%聚丙烯酰胺凝胶

() *Avr* 基因位点的电子物理作图. 由于 *Avr* 基因位点的遗传图谱是根据物理位置特异性标记 (physical position-ready marker) 构建的, 那么可以通过 BIA 法, 利用软件 BLASTN (<http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/annotation/magnaporthe/blast>) 将与 *Avr* 基因连锁的标记着陆在参考菌株 70-15 的超重叠群上. 然后, 基于网上的参考序列, 按照文献[26,31~33]的方法完成 *Avr* 基因位点的电子物理图谱的构建.

2 结果

2.1 后代群体中 *Avr* 基因的遗传分析

2 个亲本菌株 CHL346 和 CHL42 分别接种在单基因系品种 IRBL7-M 和感病对照品种 Sariceltik 上测试它们的致病性. 二者在 IRBL7-M 上表现分明的非致病性和致病性反应, 其中 CHL346 表现为无毒性, 而 CHL42 表现为毒性. 作为对照的感病品种 Sariceltik 在所有的接种实验中都是充分发病的, 说明接种条件是适宜的.

在遗传杂交实验中, 2 个亲本菌丝生长的交界处产生了大量的子囊壳. 通过单孢分离, 得到了 189 个子囊孢子单孢菌株. 这 189 个子囊孢子后代菌株也分别在上述同样的实验条件下进行了致病性测定. 在所有的实验中, 每个子囊孢子菌株在 IRBL7-M 上都表现了分明的致病性反应. 无毒性菌株和毒性菌株的分离比为 91:98, 符合 1:1 的比率 ($\chi^2 = 0.19$, $P = 0.5 \sim 0.75$). 据此推断, 亲本菌株 CHL346 对单基因系品种 IRBL7-M 的无毒性是由单基因控制的, 因此, 由 CHL346 和 CHL42 杂交产生的后代群体可以构成一个合适的作图群体. 由于 IRBL7-M 含有对亲本菌株起作用的抗性基因 *Pi7*, 因此, 把与该 *R* 基因相对应的 *Avr* 基因命名为 *AvrPi7*.

2.2 *AvrPi7* 位点的初步定位

为了确定 *Pi7* 位点的染色体位置, 利用混合群体分离法 (bulked-segregant analysis, BSA) [34] 筛选了均匀分布在稻瘟病菌 7 条染色体上的 121 个 SSR 标记. 在位于第一染色体上的 15 个标记中, MS1-3, MS1-5, MS1-6, MS1-7, MS1-8, MS1-9, MS1-13 和 MS1-15 等 8 个标记都在 2 个亲本和 2 个基因池之间检测到了多态, 因此这些标记可以作为连锁分析的候选标记. 随后, 用这些标记对构成无毒性基因池和毒性基因池的菌株个体进行了初步的连锁分析, 结果证实, 所有这些候选标记都与该 *Avr* 基因连锁 (数据未列出).

为了进一步分析该 *Avr* 基因位点与这些标记之间的连锁关系, 利用 8 个标记分析了所有 189 个子囊孢子菌株. 结果表明, 在 8 个标记覆盖的染色体区域内检测到了 4 个重组位点: 第 1 个重组点是由 4 个标记 MS1-3, MS1-5, MS1-6 和 MS1-7 组成的标记簇 (Cluster), 检测到了 12 个重组体, 该点 (簇) 距离无毒基因位点约 6.4 cM; 第 2 个重组点是由标记 MS1-8 和 MS1-13 组成的标记簇 (Cluster), 在此位置上, 检测到 7 个重组体, 距离无毒基因位点 ~3.7 cM; 第 3 个重组点在标记 MS1-9 处, 检测到 6 个重组体, 距离无毒基因位点 ~3.2 cM; 第 4 个重组点位于标记 MS1-15 处, 检测到 31 个重组体, 距离无毒基因位点 ~16.4 cM; 由于在标记 MS1-15 位点检测到的重组体不同于在标记 MS1-3 到 MS1-9 处检测到的重组体, 说明 *AvrPi7* 位点位于 TEL1 侧的标记 MS1-3 到 MS1-9 和 TEL2 侧的标记 MS1-15 之间的侧翼区域 (图 1). 因此, 两侧

图 1 无毒基因 *AvrPi7* 位点的遗传图谱

遗传距离是根据本研究的数据计算得出. 图中整合的数据分别来自: () 文献[35]; () 本研究中第 1 轮开发的标记; () 本研究中第 2 轮开发的引物; () 文献[30]. 标记类型: MS, 微卫星标记; CAG, 候选无毒基因标记; ASP, 2 等位基因特异性扩增多态性标记; TEL, 端粒

图 2

(a) *AvrPi7* 位点的物理图谱。长水平线表示含有该位点的物理区域。短竖线表示与 *AvrPi7* 位点连锁的标记的位置。括号里的数字表示在相应的标记位点检测到的重组事件。长线下的数字是根据标记的物理位置计算出来的相对物理距离(用 kb 表示), 这些标记是根据国际稻瘟病基因组计划(International Rice Blast Genome Project, IRBGP, <http://www.riceblast.org>)公布的参考序列开发的。标记的类型和来源参考图 1。(b) 根据 FGL 数据库(<http://www.fungal.genomics.ncsu.edu>)构建的 *AvrPi7* 位点的超重叠群图谱。短水平线表示引自 IRBGP 数据库里的超重叠群。虚线表示相应标记的相对位置

最近的标记位点 MS1-9 和 MS1-15 作为下一步染色体步移的起点(图 1 和 2)。

2.3 *AvrPi7* 位点的精细作图

为了进一步精细定位该 *Avr* 基因位点, 我们在 MS1-9 和 MS1-15 的侧翼序列区域开发了另外 7 个 SSR 标记。在这些标记中, 3 个标记 MS1-21, MS1-22 和 MS1-25 在亲本之间检测到了多态性。利用来自 MS1-9 和 MS1-15 的 39 个重组体对这 3 个标记进行了进一步的连锁分析。结果表明, 在 TEL1 侧的 MS1-22 位点仅检测到了 2 个重组体, 遗传距离为 1.1 cM; 而在 TEL2 侧的 MS1-21 和 MS1-25 位点分别检测到了 1 和 29 个重组体, 遗传距离分别为 0.5 和 15.3 cM。因此 *AvrPi7* 位点被进一步地界定在了 MS1-21 和 MS1-22 侧翼 1.6 cM 的区间内(表 2, 图 1, 2)。

Farman 等人^[30]认为, *AVR1-CO39* 位于靠近 *AvrPi7* 位点的区域。为了分析 *AVR1-CO39* 和 *AvrPi7* 位点在物理位置上的关系, 利用 30 个重组体对根据 *AVR1-CO39* 等位基因序列开发的标记 ASP-CO39 进行了连锁分析。在 ASP-CO39 位点鉴定到了 2 个重组体。这也证实了 *AVR1-CO39* 和 *AvrPi7* 位点在遗传上是相互独立的, 且相距 1.1 cM(表 2, 图 1)。

需要指出的是, 在 MS1-3 到 MS1-9 和 MS1-15

中作为正常的重组体出现的菌株 M063 和 M087, 在 MS1-22, MS1-25 和 ASP-CO39 位点中表现为异常的重重组体(杂合的基因型, 表 2, 图 3)。在调整了 PCR 扩增条件后仍表现为相同的结果。

为了更进一步精细定位该 *Avr* 基因位点, 根据公共数据库中注释的基因, 我们在 MS1-22 和 MS1-21 之间的侧翼序列开发了 3 个 CAG 标记。在这 3 个标记中, 仅有 CAG2 在亲本间表现了明显的多态性。利用 MS1-22 和 MS1-21 位点的重组体对 CAG2 进行的连锁分析证明, 这个标记同目标基因完全共分离(表 2, 图 1 和 2)。至此, 利用 *AvrPi7* 位点侧翼 13 个标记检测到的 43 个重组体(表 2), 我们构建了该位点的高分辨率的遗传图谱(图 1)。

2.4 *AvrPi7* 位点的物理图谱

根据物理位置特异性标记构建了 *AvrPi7* 位点的遗传图谱之后, 利用 BIA 法将这些锚标记的序列与参考序列进行比对, 从而构建出该位点相应的物理图谱。最终, *AvrPi7* 位点被界定在超重叠群 13 和 17 之间 75.0 kb 的区域内(图 2)。根据基因注释系统 Softberry FGENESH, 在这个区域预测到 3 个编码假定蛋白(hypothetical protein)的候选基因。

图3 SSR 标记 MS1-25 在作图群体的部分子囊孢子菌株中与 *AvrPi7* 基因的共分离
泳道 1, DNA 分子量标记 DL2000; 泳道 2, 无毒亲本菌株 CHL346; 泳道 3, 毒性亲本菌株 CHL42; 泳道 4~20, 后代菌株. 箭头所指为标记 MS1-25 的 SSR 等位基因. A, 无毒菌株; V, 有毒菌株; *, 发生重组的菌株; **, 基因组为部分二倍体的后代菌株(M063)

表 2 43 个发生重组的菌株在与 *AvrPi7* 位点连锁的 13 个标记位点的基因型^{a)}

标记	1 个菌株	26 个菌株	4 个菌株	5 个菌株	1 个菌株	4 个菌株	2 个菌株
MS1-3	m	m	m	M	M	M	M
MS1-7	m	m	m	M	M	M	M
MS1-5	m	m	m	M	M	M	M
MS1-6	m	m	m	M	M	M	M
MS1-13	m	m	m	m	M	M	M
MS1-8	m	m	m	m	M	M	M
MS1-9	m	m	m	m	m	M	M
ASP-CO39 ^{b)}	m	m	m	m	m	m	H
MS1-22	m	m	m	m	m	m	H
CAG2	m	m	m	m	m	m	m
MS1-21	M	m	m	m	m	m	m
MS1-25	M	M	m	m	m	m	H
MS1-15	M	M	M	m	m	m	m

a) m 表示菌株个体与亲本菌株 CHL346 或 CHL42 一致的基因型; M 表示正常的重组类型; H 表示非正常的重组类型(出现了 2 个亲本基因型的杂合的基因型). b) 该标记是为了区分 *AVR1-CO39* 和 *AvrPi7* 位点的物理位置而根据 *AVR1-CO39* 等位基因的序列开发的标记(参照图 1)

3 讨论

图位克隆是一种不需要预先知道基因的产物, 但要求具备含有目标基因高分辨率的遗传和物理图谱而进行基因分离的方法. 在植物病原菌 *Cladosporium fulvum*^[36], *M. oryzae*^[9,23,24,37], *Phytophthora sojae*^[38] 和 *Leptosphaeria maculans*^[39] 中, 已经通过图位克隆方法先后克隆到了几个无毒基因. 本实验室最近也利用这种方法构建了水稻 *R* 基因 *Pi36*^[32] 和 *Pi37*^[31], *Avr* 基因 *AvrPi15*^[26] 和稻飞虱 *R* 基因 *bph19*^[33] 的高分辨率图谱. 在本研究中, 我们采用了一个有效的策略完成了一个新 *Avr* 基因 *AvrPi7* 的遗传

和物理作图. 首先, 基于参考菌株 70-15 的全基因组序列开发了一套均匀地分布于稻瘟病菌全基因组 7 条染色体上的 121 个 SSR 标记, 并将其用于在一个后代群体中鉴定到的 *Avr* 基因的初步定位. 随之, 为了对目标基因位点进行精细定位, 在一个较小的染色体范围内开发另外的 SSR 标记和 CAG 标记, 并进行了连锁分析; 最后, 为了构建目标基因的物理图谱, 根据 BIA 法, 利用目标基因的连锁标记组装了基于参考序列的超重叠群. 至此, 我们在没有构建供体菌株 CHL346 的人工染色体文库的情况下, 仅仅利用基于参考序列的 PCR 标记就构建了 *AvrPi7* 位点的高分辨率图谱, 这种策略在一定程度上大大节省了时间和劳力.

利用序列特异性标记构建的高分辨率图谱不仅能够明确地对应于遗传区间的精确的物理距离, 而且还可以确定在减数重组过程中“冷点”和“热点”的发生^[40]. 本研究观察到了第 1 染色体上极端的重组不平衡现象. 在 MS1-3 到 MS1-6 (Cluster) 和 MS1-13 到 MS1-8 (Cluster) 的区间内观察到了重组“冷点”, 而重组“热点”则在 MS1-9 到 CAG2 (TEL1 侧) 和 CAG2 到 MS1-25 (TEL2 侧) 的区间内. 在 TEL1 侧观察到的热点位置, 在 275 kb 的区间内检测到了 6 个重组体, 这相当于平均每 45.8 kb 发生一次重组; 而在 TEL2 侧观察到的热点中, 240 kb 的区间内检测到了 29 个重组体, 则相当于平均每 8.3 kb 发生一次重组. 相反, 在 670 kb (Cluster) 和 2 Mb (Cluster) 的冷点区域内都没有检测到重组的发生, 即使在这些区域中分别有 3 和 4 个多态标记. 重组抑制的现象一般是由于目

的基因位于着丝粒的近端区域^[41]或是亲本基因型之间缺少序列同源性^[42]导致的。前者曾在 *Neurospora crassa*^[41]和酵母菌^[43]中观察到,这可能是引起本研究在 Cluster 处观察到的重组“冷点”的主要原因,因为,在以前的研究中也认为这个位置位于第 1 染色体的着丝粒区域^[9]。而 Cluster 处观察到的重组“冷点”则可能是由于亲本菌株之间缺乏序列同源性造成的。吴伟怀等人^[44]已经通过分子指纹和致病型分析,证明了在江苏和云南的稻瘟病菌群体之间存在高度的遗传多样性和特异性。这可能是由于受到不同的生态和遗传选择压力而导致了不同地理来源的亲本菌株具有了不同的基因组结构。幸运的是,目标基因 *AvrPi7* 位点位于一个重组活跃的区域。这个区域之所以成为交换的热点区域,部分的原因在于该区域出现了与寄主植物中新的 *R* 基因相对应的新 *Avr* 基因^[45]。

稻瘟病菌是单倍体的病原菌,基因组由 7 条染色体组成^[2,35]。因此,在其基因组中形成杂合的基因型似乎是不可能的。然而,在作图群体的 189 个子囊孢子后代中,2 个菌株, M063 和 M087 在 MS1-22, MS1-25 和 ASP-CO39 中出现了杂合的基因型。最初,我们认为这可能是由于来自不同基因型后代菌株的污染造成的。然而,通过利用相同群体对另外一个 *Avr* 基因 *AvrPi15* 的定位结果,排除了这种可能性。也就是说,在这 189 个子囊孢子菌株中不存在菌株或是 DNA 的污染。那么,最有可能的解释是在这 2 个后代菌株的基因组中由于超数染色体 (supernumerary chromosome) 的存在而形成了部分二倍体 (merodiploid)。

部分二倍体通常是在含有 F' 质粒的细菌细胞中观察到的。在这种类型的细胞中,基因组携带部分区域的 2 个拷贝,因此位于这个区域的基因或标记表现为 2 个等位基因^[46]。与 F' 质粒相似,超数染色体是真菌基因组中片段比较小,主要由 DNA 组成的“额外”的染色体,然而它并不存在于真菌所有的菌株中。很多研究者已经证实了在来自水稻和谷子的大多数菌株中都存在超数染色体^[35,47,48]。最近, Luo 等人^[3]报道了与亲本菌株 Y93-245c-2 相比,另一亲本菌株 84R-62B 存在一条大小为 1.6 Mb 的“额外”的染色体,并且这条染色体事实上是第 1 染色体的断裂而产生的一个片段。染色体的重排是超数染色体形成的一个重要机制^[49]。在本研究中,后代菌株 M063 和 M087 基因组中可能也存在一条“额外”的染色体。这

可能是由于 2 个亲本菌株的基因组具有不同长度的第一染色体,当这 2 个菌株染色体的同源序列之间发生易位重组时,较长的染色体发生断裂,这条断裂下来的片段表现在后代菌株的基因组中则成为一条游离的、“额外”的染色体,即超数染色体。那么,相应地,这些后代菌株的基因组表现为部分二倍体。总之,对于部分菌株而言,它们之所以在某些区域形成杂合的基因型,是因为在这些区域中,在“额外”的染色体和其完整的染色体上存在相匹配的序列。目前,我们正在按照上述描述的方法^[3,50]来验证这个假说。

本研究的结果进一步证明了稻瘟病菌全基因组参考序列的利用大大地加速了相关基因的精细作图。高分辨率的遗传和物理图谱也为研究稻瘟病菌致病性变异的基因组学基础提供了重要的线索。当然,也为目标基因的分离打下了坚实的基础。目前,该 *Avr* 基因的克隆和遗传转化正在进行中。

致谢 感谢朱有勇博士和郑小波博士为本研究提供亲本菌株。

参 考 文 献

- 1 Ou S H. Rice diseases. 2nd ed. England: Commonwealth Mycological Institute, 1985. 109—201
- 2 Dean R A, Talbot N J, Ebbole D J, et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature, 2005, 434: 980—986[DOI]
- 3 Luo C X, Yin L F, Koyanagi S, et al. Genetic mapping and chromosomal assignment of *Magnaporthe oryzae* avirulence genes *AvrPik*, *AvrPiz*, and *AvrPiz-t* controlling cultivar specificity on rice. Phytopathology, 2005, 95: 640—647
- 4 Flor H. Current status of the gene-for-gene concept. Annu Rev Phytopathol, 1971, 9: 275—296
- 5 Hebert T T. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. Phytopathology, 1971, 61: 83—87
- 6 Notteghem J L, Tharreau D, Silue D, et al. Present knowledge of rice resistance genetics and strategies for *Magnaporthe grisea* pathogenicity and avirulence gene analysis. In: Zeigler R S, Leong S A, Teng P S, eds. Rice Blast Disease. Wallingford: CAB International, 1994. 155—165
- 7 Leung H, Williams P H. Genetic analyses of electrophoretic enzyme variants, mating type, and hermaphroditism in *Pyricularia oryzae* Cavara. Can J Genet Cytol, 1985, 27: 697—704
- 8 Leung H, Borromeo E S, Bernardo M A, et al. Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Phytopathology, 1988, 78: 1227—1233
- 9 Farman M L, Leong S A. Chromosome walking to *AVR1-CO39* avirulence gene of *Magnaporthe grisea* discrepancy between the physical and genetic maps. Genetics, 1998, 150: 1049—1058
- 10 Smith J R, Leong S A. Mapping of *Magnaporthe grisea* locus affecting rice (*Oryza sativa*) cultivar specificity. Theor Appl Genet, 1994, 88: 901—908
- 11 Lau G W, Chao C T, Ellingboe A H. Interaction of genes controlling avirulence/virulence of *Magnaporthe grisea* on rice cultivar Katy. Phytopathology, 1993, 83: 375—382
- 12 Silue D, Tharreau D, Notteghem J L. Identification of *Mag-*

- naporthe grisea* avirulence genes to seven rice cultivars. *Phytopathology*, 1992, 82: 1462—1467
- 13 Dioh W, Tharreau D, Notteghem J L, et al. Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, with RFLP and RAPD markers. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, 13: 217—227
- 14 王宝华, 鲁国东, 林伟明, 等. 稻瘟病菌无毒基因 *Avr-Pi1*, *Avr-Pi2* 和 *Avr-Pi4a* 的遗传分析及其分子标记. *遗传学报*, 2002, 29: 820—826
- 15 李成云, 罗朝喜, 李进斌, 等. 稻瘟病菌无毒基因的分子标记. *中国农业科学*, 2000, 33: 49—53
- 16 林菲, 李进斌, 李成云, 等. 2002. 利用 RAPD 分子标记定位两个水稻稻瘟病菌非致病性基因. *中国农业科学*, 2002, 35: 1079—1084
- 17 Hayashi N, Li C Y, Li J R, Naito H. *In vitro* production on rice plants of perithecia of *Magnaporthe grisea* from Yunnan, China. *Mycol Res*, 1997, 101: 1308—1310[DOI]
- 18 Valent B, Chumley F G. Avirulence genes and mechanisms of genetic instability in the rice blast fungus. In: Zeigler R, Leong S A, Teng P S, eds. *Rice Blast Disease*. Wallingford: CAB International, 1994. 111—134.
- 19 Valent B, Chumley F G. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Phytopathol*, 1991, 29: 443—467[DOI]
- 20 Yasuda N, Fujita Y, Noguchi M. Identification of avirulence genes in the rice blast fungus corresponding to three resistance genes in Japanese differentials. *J Gen Plant Pathol*, 2004, 70: 202—206
- 21 Yasuda N, Noguchi M T, Fijita Y. Identification of an avirulence gene in the fungus *Magnaporthe grisea* corresponding to a resistance gene at the *Pik* locus. *Phytopathology*, 2005, 95: 768—772
- 22 刘俊峰, 董宁, 侯占军, 等. 稻瘟病菌对水稻品种梅雨明的无毒性的遗传分析和分子标记. *植物病理学报*, 2001, 31: 10—15
- 23 Orbach M J, Farrall L, Sweigard J A, et al. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell*, 2000, 12: 2019—2032[DOI]
- 24 Böhnert H U, Fudal I, Dioh W, et al. A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistance rice. *Plant cell*, 2004, 16: 2499—2513[DOI]
- 25 Lauge R, De Wit P J G M. Fungal avirulence genes: Structure and possible functions. *Fungal Genet Biol*, 1998, 24: 285—297[DOI]
- 26 Ma J H, Wang L, Feng S J, et al. Identification and fine mapping of *AvrPi15*, a novel avirulence gene of *Magnaporthe grisea*. *Theor Appl Genet*, 2006, 113, 875—883[DOI]
- 27 Pan Q H, Hu Z D, Tanisaka T, et al. Fine mapping of the blast resistance gene *Pi15*, linked to *Pii*, on rice chromosome 9. *Acta Bot Sin*, 2003, 45: 871—877
- 28 Tsunematsu H, Yanoria M J T, Ebron L A, et al. Development of monogenic lines of rice for blast resistance. *Breed Sci*, 2000, 50: 229—234
- 29 Pan Q H, Wang L, Ikehashi H, et al. Identification of a new blast resistance gene in the *indica* rice cultivar Kasalath using Japanese differential cultivars and isozyme markers. *Phytopathology*, 1996, 86: 1071—1075[DOI]
- 30 Farman M L, Eto Y, Nakao T, et al. Analysis of the structure of the *AVR1-CO39* avirulence locus in virulent rice-infecting isolates of *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15: 6—16
- 31 Chen S, Wang L, Que Z Q, et al. Genetic and physical mapping of *Pi37(t)*, a new gene conferring resistance to rice blast in the famous cultivar St.No.1. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1563—1570[DOI]
- 32 Liu X Q, Wang L, Chen S, et al. Genetic and physical mapping of *Pi36(t)*, a new rice blast resistance gene located on rice chromosome 8. *Mol Gen Genomics*, 2005, 274: 394—401[DOI]
- 33 Chen J W, Pang X F, Wang L, et al. Genetic analysis and fine mapping of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene *bph19(t)*. *Mol Gen Genomics*, 2006, 275: 321—329[DOI]
- 34 Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9828—9832[DOI]
- 35 Nitta N, Farman M L, Leong S A. Genome organization of *Magnaporthe grisea*: Integration of genetic maps, clustering of transposable elements and identification of genome duplications and rearrangements. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 20—32[DOI]
- 36 Joosten M H A J, Cozijnsen T J, De Wit P J G M. Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature*, 1994, 367: 384—386[DOI]
- 37 Sweigard J A, Carroll A M, Kang S, et al. Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *Plant Cell*, 1995, 7: 1221—1233[DOI]
- 38 Shan W X, Cao M, Leung D, et al. The *Avr1b* locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene *Rps1b*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17: 394—403
- 39 Gout L, Fudal I, Kuhn M L, et al. Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Mol Microbiol*, 2006, 60: 67—80[DOI]
- 40 Schuler G D. Sequence mapping by electronic PCR. *Genome Research*, 1997, 7: 541—550
- 41 Davis C R, Kempainen R R, Srodffs M S, et al. Correlation of the physical and genetic maps of the centromere region of the right arm of linkage group III of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 1994, 136, 1297—1306
- 42 Chauhan R S, Farman M L, Zhang H B, et al. Genetic and physical mapping of the rice blast resistance locus, *Pi-CO39(t)*, that corresponds to the avirulence gene *AVR1-CO39* of *Magnaporthe grisea*. *Mol Gen Genomics*, 2002, 26: 603—612[DOI]
- 43 Clarke L, Carbon J. Isolation of the centromere-linked *CDC10* gene by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1980, 77: 2173—2177[DOI]
- 44 吴伟怀, 王玲, 潘庆华. 江苏省和云南省的两个稻瘟病菌群体的遗传结构的比较. *中国热带作物*, 2006, 17: 95—100
- 45 Sun X, Yang Z, Wang S, et al. Identification of a 47-kb DNA fragment containing *Xa4*, a locus for bacterial blight resistance in rice. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 683—687
- 46 Hartl D L, Jones E W. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*. 5th ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 2001. 393—443
- 47 Covert S F. Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Curr Genet*, 1998, 33: 311—319[DOI]
- 48 Orbach M J, Chumley F G, Valent B. Electrophoretic karyotypes of *Magnaporthe grisea* pathogens of diverse grasses. *Mol Plant Microbe Interact*, 1996, 9: 261—271
- 49 Enkerli J, Reed H, Briley A, et al. Physical map of a conditionally dispensable chromosome in *Nectria haematococca* mating population VI and location of chromosome breakpoints. *Genetics*, 2000, 155: 1083—1094
- 50 Chuma I, Tosa Y, Taga M, et al. Meiotic behavior of a supernumerary chromosome in *Magnaporthe oryzae*. *Curr Genetic*, 2003, 43: 191—198