

稻曲病菌 UV-2 菌株细菌人工染色体文库构建及分析

刘庆丽¹ 王晓明¹ 王革娇¹ 罗朝喜² 谭新球³ 罗美中^{1*}

- (1. 华中农业大学 生命科学技术学院 湖北 武汉 430070)
- (2. 华中农业大学 植物科学技术学院 湖北 武汉 430070)
- (3. 湖南省农业科学院植物保护研究所 湖南 长沙 410125)

摘要: 【目的】稻曲病(Rice false smut)是由稻曲病菌[*Villosiclava virens* (Cooke) Tak.]引起的严重危害水稻的真菌病害。构建稻曲病菌 UV-2 的大片段 DNA 细菌人工染色体(Bacterial artificial chromosome, BAC)文库,为致病相关基因的鉴定及在图位克隆、比较基因组学等方面的研究奠定基础。【方法】以幼嫩菌丝为材料制备大分子基因组 DNA 包埋块,用 *Hind* III 部分酶解后经脉冲凝胶电泳筛选,回收大片段 DNA 并与 pIndigoBAC536-S 载体连接,连接产物转化大肠杆菌菌株 DH10B T1 Phage-Resistant 细胞后进行蓝白斑筛选,白色菌落转入 384 孔板置于-80 °C 低温保存。【结果】成功构建 UV-2 菌株的高质量、高覆盖度的 BAC 文库,该文库共含 10 368 个克隆,平均插入片段为 124.4 kb,空载率小于 1%,约覆盖该菌基因组的 36.8 倍。【结论】克服了真菌大分子基因组 DNA 制备难控制的技术难题,建立了首个稻曲病菌的 BAC 文库。该文库已作为一种公共基因组资源向研究者开放(<http://GResource.hzau.edu.cn>)。

关键词: 大分子 DNA, 细菌人工染色体, 水稻, 稻曲病, 稻曲病菌

基金项目: 农业部公益性行业专项项目(No. 200903039-3)

*通讯作者: Tel: 86-27-87284213; ✉: mzl原因@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2012-11-13; 接受日期: 2013-01-06

Construction of a bacterial artificial chromosome library of *Villosiclava virens* UV-2 genome

LIU Qing-Li¹ WANG Xiao-Ming¹ WANG Ge-Jiao¹ LUO Chao-Xi²
TAN Xin-Qiu³ LUO Mei-Zhong^{1*}

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

(2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

(3. Hunan Plant Protection Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410125, China)

Abstract: [Objective] Rice false smut caused by *Villosiclava virens* (Cooke) Tak. is a serious fungal disease of rice. This study aimed to construct a high molecular weight bacterial artificial chromosome (BAC) library of UV-2 genome. The BAC library will help identify pathogenicity-associated genes and provide genome resource for map-based cloning and comparative genomic analysis. [Methods] High molecular weight genomic DNA was isolated from young mycelia of UV-2 strain, digested with restriction enzyme *Hind* III and size selected by PFGE. Large genomic DNA fragments were recovered and ligated to the pIndigoBAC536-S vector. The ligation product was used to transform the *Escherichia coli* strain DH10B T1 Phage-Resistant cells and the transformants were selected on a blue-white selection medium. White colonies were individually picked into 384-well microtiter plates and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. [Results] We constructed a high quality deep coverage BAC library of UV-2 strain. The BAC library consisted of 10 368 clones with an average insert size of 124.4 kb and an empty clone rate of lower than 1%, covering 36.8-fold of the UV-2 genome. [Conclusion] We established a method for preparation of fungal high molecular weight genomic DNA, and constructed the first BAC library of *V. virens* genome successfully. The BAC library has been opened to researchers as a public genomic resource (<http://GResource.hzau.edu.cn>).

Keywords: High molecular weight DNA, Bacterial artificial chromosome, Rice, Rice false smut, *Villosiclava virens*

稻曲病菌[*Villosiclava virens* (Cooke) Tak.]有性阶段归类到真菌子囊菌亚门麦角菌科 *Villosiclava* 属, 其无性阶段为 *Ustilaginoidea virens* (Cooke) Tak., 在分类上属于真菌半知菌亚门绿核菌属^[1]。由稻曲病菌引起的水稻穗期病害

稻曲病(Rice false smut)是水稻穗部发生的一种真菌性病害, 又称黑穗病或丰收病, 以前一直把它作为次要病害来防治^[2]。但自 70 年代以来, 由于杂交水稻的推广及施肥的增加, 该病发生逐年严重, 目前已成为除稻瘟病、纹枯病外的又一严重

威胁水稻产量和质量的重大病害。稻曲病菌可产生含有微管蛋白抑制剂的稻曲毒素,可抑制细胞的有丝分裂^[1],不仅对水稻的胚根、胚芽均有抑制作用^[3-4],还引起畜禽食物中毒^[5],对人类的健康也构成直接的危害。

迄今,国内外对稻曲病的研究多集中在发病规律和病害综合防治方面,对稻曲病菌与植物相互作用机制,稻曲病菌侵染水稻的途径、稻曲病菌地理分布、遗传多样性等方面尚不明确^[6]。2003年,张君成等以菌株 UV-2、UV-12 为材料对分生孢子的生物学特性进行了研究,推测分生孢子可引起水稻发病^[7],但也有人将子囊孢子^[8]、厚垣孢子^[9]成功接种水稻并引发病害。另外,稻曲病菌分子生物学和遗传学方面的研究也较少,2003年,周永力等^[10]对稻曲病菌及其同属近缘真菌 18S rRNA 基因、5.8S rRNA 和 ITS 等的核酸序列进行了比较,并利用巢式 PCR 检测了稻曲病菌在田间和水稻植株上的分布。2004年,张震等^[11]以潮霉素和绿色荧光蛋白为选择标记,利用根癌农杆菌实现了对稻曲病菌 UV-7 的遗传转化,为研究病原真菌的分子致病机制提供了有力手段。2012年,李燕等^[12]利用 rep-PCR 分子指纹图谱分析了来自江苏省 5 个稻区 48 株稻曲病菌的群体遗传多样性,认为这 48 株稻曲病菌的 BOX、REP、ERIC 族群分类与地理位置、致病类型均无显著的相关性。

细菌人工染色体^[13](Bacterial artificial chromosome, BAC)载体系统是在 F 因子的基础上发展起来的。BAC 文库技术以具有插入片段大、遗传稳定、嵌合体少、易于操作等显著优势,已成为基因组学研究的大分子 DNA 储存库,并被广泛用于各种真核生物的完整基因克隆、物理图谱制作、比较基因组学和全基因组测序等研究^[14-15]。本实验室近年构建了包括水稻、玉米、高粱等的 BAC 文库,作为一种公共资源已向研究者开放(<http://GResource.hzau.edu.cn>)。真菌的基因组相

对于高等生物小很多,但构建真菌的 BAC 文库同样非常重要,然而,成功构建的真菌 BAC 文库并不多,主要因为存在一些技术上的难题。不同真菌的大分子量基因组 DNA 的制备方法不同,同一个种不同菌株的大分子基因组 DNA 制备条件也不尽相同,另外真菌培养过程中的培养基成分也会对 DNA 制备造成影响。

介于目前对稻曲病菌致病和防治的分子机理还知之甚少,基因组层面的研究和了解更是微乎其微,至今还没有一个稻曲病菌全基因组序列和 BAC 基因组资源供研究者使用,因此,开展稻曲病菌基因组方面的研究至关重要。本研究以稻曲病菌 UV-2 菌株为材料,构建了一个高质量、高覆盖度的 BAC 文库。该文库的建立将加速新基因发现和克隆以及全基因组测序与组装,为深入开展稻曲病菌抗性机制的研究提供基因组资源。

1 材料与方 法

1.1 稻曲病菌的培养

稻曲病菌 UV-2 菌株由江苏省农业科学研究院植物保护研究所陈志谊研究员惠赠。将 UV-2 菌株在马铃薯蔗糖固体培养基(PSA)上活化培养 4 d,然后接种幼嫩菌丝于铺有一层玻璃纸的 PSA 培养基之上,28 °C 培养 3 d,收取培养所得幼嫩菌丝磨碎接种于 100 mL 完全培养基^[16-17]中,180 r/min、28 °C 摇床培养 2 d,用于大分子基因组 DNA 包埋块的制备。

1.2 UV-2 菌株大分子基因组 DNA 包埋块的制备

BAC 文库构建参照我们以前的方法^[14-15,18]进行。将 1.1 中的约 50 g 菌丝用纱布过滤,用灭菌双蒸水洗 2 次,再用 0.7 mmol/L NaCl 洗 2 次,最后用 50 mL 0.7 mmol/L NaCl 悬浮菌丝,加崩溃酶(Driselase, Sigma)至终浓度为 10 g/L,100 r/min、31 °C 条件下反应 4 h,用两层纱布和一层

Miracloth (Calbiochem)过滤反应产物, 收取滤液, 1 500×g 离心 15 min 得到原生质体沉淀。用 40 mL 0.7 mmol/L NaCl 悬浮原生质体, 再离心, 用 1 mL 1.2 mol/L 山梨醇重悬, 与等体积的 1%低熔点琼脂糖(1.2 mol/L 山梨醇溶解)混匀后, 转移到模具内, 冰上放置约 30 min; 待包埋块(Plug)形成后, 转入含 40 mL 1 g/L 蛋白酶 K (Sigma)溶液(由 1% N-lauroylsarcosine 配置)的 50 mL 离心管中, 50 °C 酶解 2×24 h (中间更换蛋白酶 K 溶液 1 次)。酶解后取出 Plug, 室温下用含 1 mmol/L PMSF (苯甲基黄酰氟)的 T₁₀E₁₀ (10 mmol/L Tris-HCl 和 10 mmol/L EDTA, pH 8.0)洗 2 次, 然后用 TE (10 mmol/L Tris-HCl 和 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)再洗 2 次, 每次 1 h, 并不时摇动; 洗涤后, 放入 TE 中, 4 °C 保存备用。

1.3 部分酶解及大片段 DNA 的第一次筛选

大片段 DNA 通过控制限制性内切酶 *Hind* III 的用量及酶解反应时间对稻曲病菌基因组随机酶解获得, 为寻找合适的酶解浓度和酶解时间, 需要对每一批 DNA 包埋块进行预酶解, 参照之前做过的真菌的酶解条件, 对 UV-2 的最佳酶解条件进行预测, 并在预测值附近设置条件进行部分酶解。另外, 由于在 DNA 量低且对酶敏感时, 采用较高的酶浓度和较短的酶解时间条件组合比较低酶浓度和较长酶解时间的条件组合更方便酶浓度的精确配制、酶解结果可重复性强, 也更易获得较多量的 DNA 片段, 因此, 部分酶解的预备实验中设置了两组不同的梯度: 0.2、0.3 U/18 min 和 0.4、0.6 U/15 min。部分酶解时每个酶解体系加入 25 μ L H₂O、10 μ L 10×Buffer、10 μ L 40 mmol/L Spermidine (Sigma)、5 μ L 不同单位的 *Hind* III 酶、切碎的 1/2 Plug, 置于 37 °C 水浴锅中进行酶解反应。酶解反应结束后, 用脉冲凝胶电泳检测酶解结果。电泳条件为 0.5×TBE、14 °C、1–50 s、120°、6 V/cm、18 h。根据电泳

结果选取最适合的酶解浓度和时间, 然后以此酶解条件进行 18 个相同的酶解反应上样在一个合并的上样孔内, 两侧孔内放置 λ ladder PFG marker (NEB), 通过脉冲凝胶电泳进行分离, 即第一次筛选。电泳结束后, 将两侧样品约 0.5 cm 大小连同样品两侧的 λ ladder PFG marker 胶条切下置于(0.5 mg/L)溴化乙锭溶液中染色, 脱色后, 将直尺置于胶块上进行凝胶成像分析。

1.4 大片段 DNA 的第 2 次筛选和洗脱回收

根据凝胶成像结果和对应的直尺刻度, 从未用溴化乙锭染色的第 1 次筛选胶块中切下 110–220 kb 和 220–300 kb 大小范围的胶条进行第 2 次筛选。电泳条件为 0.5×TBE、14 °C、4–4 s、120°、6 V/cm、18 h。按照第 1 次筛选的方法回收胶条, 并按分子量大小范围进一步将每一胶条上下切成两条差不多大小的两条, 分别命名为 a1、a2 (a2>a1), b1、b2 (b2>b1), 为获得完整的大片段 DNA, 采用电洗脱法回收胶块中的 DNA, 并检测洗脱浓度。

1.5 克隆载体的制备

克隆载体的连接转化效率和蓝白斑率的高低会直接影响到的文库的质量, 高质量的载体是构建高质量文库的前提。克隆载体 pIndigoBAC536-S 由本实验室从 pIndigoBAC536^[18]改建而来, 其高拷贝复合载体命名为 pHZAUBAC1^[15], pHZAUBAC1 克隆载体使用 Qiagen 中提试剂盒抽提, 获得 pHZAUBAC1 质粒后经 *Hind* III 酶解、FastAP (Fermentas)脱磷、自连、脉冲凝胶电泳筛选、洗脱, 回收低拷贝载体 pIndigoBAC536-S, 其详细方法见文献[14–15]。回收的载体 DNA 用不同浓度的 λ DNA 标样比对浓度后, 将浓度调至 6 mg/L 和 30%–40%甘油, 存于–80 °C 冰箱中, 经 λ DNA/*Hind* III 片段连接转化检测合格后, 用于稻曲病菌 UV-2 BAC 文库的构建。

1.6 BAC 文库构建

将经过第 2 次筛选后的大片段 DNA 洗脱产物与载体进行连接反应。连接体系为 84 μ L DNA、4 μ L 载体、2 μ L 5 U/ μ L T4 Ligase (Fermentas)、10 μ L T4 Buffer, 16 $^{\circ}$ C 过夜。65 $^{\circ}$ C 灭活后置于脱盐胶(1%的琼脂糖+2%的葡萄糖)中脱盐 1 h, 脱盐产物置于 4 $^{\circ}$ C 备用。吸取 2 μ L 的脱盐产物与 20 μ L 的 DH10B T1 Phage-Resistant 感受态细胞 (Invitrogen)混匀后置于电转化杯中, 325 V 条件下电转化, 将转化产物于 SOC 中复苏培养 1 h 后, 涂布于含 12.5 mg/L 氯霉素, 80 mg/L X-gal, 100 mg/L IPTG 的 LB 固体培养基上, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。得到克隆后, 随机挑取一定数目的白色克隆检测插入片段大小和空载率。如达到要求则对保存在 4 $^{\circ}$ C 的连接脱盐产物进行大量转化, 挑取白色克隆于含有冰冻培养基的 384 孔板中, 置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.7 文库质量分析

从每个 384 孔板中随机挑取 4-5 个克隆, 碱裂解法抽提质粒, 并用 I -Sce I (NEB)酶解, 脉冲电泳检测插入片段。脉冲电泳条件为: 0.5 \times TBE、14 $^{\circ}$ C、5-15 s、120 $^{\circ}$ 、6 V/cm、17 h。经数据统计分析, 获得相对准确的插入片段大小及空载率信息, 进而估算整个文库的覆盖度、空载率以及平均插入片段大小。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 包埋块(Plug)的制备及部分酶解

本研究参照植物 Plug 的制备方法, 成功制备了 UV-2 的原生质体, 并将其包埋在了低熔点琼脂糖凝胶中。真菌的细胞壁坚韧, DNA Plug 较难制备, 通常制备的 Plug 中 DNA 的浓度比较低, 对内切酶非常敏感, 较低浓度的酶便会对其进行酶解, 因而增加了寻找 DNA 部分酶解合适条

件和回收大片段 DNA 的难度。图 1A 为 UV-2 DNA 用 *Hind* III 作部分酶解的预备实验结果, 电泳图谱显示, UV-2 DNA Plug 的 DNA 浓度不高, 较低浓度的酶即可产生一定的酶解结果, 随着酶浓度增加, 未被酶切的 DNA 量逐渐减少, 酶解出 DNA 片段的量逐渐增多。另外, 较高的酶浓度和较短的酶解时间的条件组合, 可获得相对比较多的 DNA 片段, 0.3 U/18 min 酶解条件得不到足够的 100-150 kb 范围 DNA 片段, 0.6 U/15 min 酶解条件有些酶解过度, 因此我们选用 0.4 U/15 min 酶解条件(37 $^{\circ}$ C)作为大片段 DNA 的制备条件。

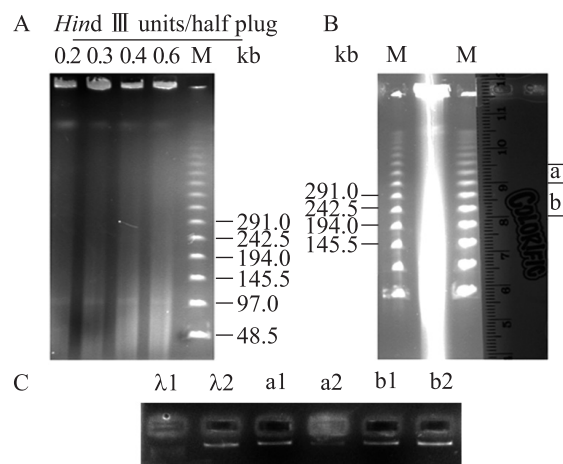


图 1 稻曲病菌 UV-2 基因组 DNA 部分酶解条件比较 (A)、大片段 DNA 第 1 次筛选(B)和第 2 次筛选后回收 DNA 浓度检测(C)

Fig. 1 Comparison of partial digestion conditions of the *Villosiclava virens* UV-2 genomic DNA (A), the first screening of large fragment DNA (B) and concentration of recovered large fragment DNA after the second screening (C)

注: 0.2 U、0.3 U: *Hind* III 于 37 $^{\circ}$ C 酶解 18 min; 0.4 U、0.6 U: *Hind* III 于 37 $^{\circ}$ C 酶解 15 min; M: λ ladder PFG 分子标记 (NEB). λ 1、 λ 2 分别为 1、2 ng DNA 标样; a1、a2、b1、b2 为 1 μ L 二次筛选后回收的 DNA。

Note: 0.2 U, 0.3 U: *Hind* III digest at 37 $^{\circ}$ C for 18 min; 0.4 U, 0.6 U: *Hind* III digest at 37 $^{\circ}$ C for 15 min; M: λ ladder PFG DNA marker (NEB); λ 1, λ 2 are the DNA standards of 1 and 2 ng respectively; a1, a2, b1, b2: 1 μ L DNA recovered after the second screening of large fragment DNA.

2.2 大片段 DNA 的两次筛选和回收

采用 *Hind* III 于 37 °C 酶解 15 min 的酶解条件, 进行 18 个相同的半个 Plug 的酶解反应, 并用脉冲凝胶电泳对大片段 DNA 进行第 1 次分离筛选。从第 1 筛的结果看(图 1B), 酶解略微有点过度, 这是因为 Plug 内 DNA 对 *Hind* III 过于敏感、正式酶解条件难以完全重复预备实验条件所致。将 110–220 kb (a)和 220–300 kb (b)区段的胶条切下进行第 2 次筛选, 将夹杂的小片段 DNA 进一步分离, 胶条 a、b 经二次筛选, 获得片段更为集中的片段 a1、a2、b1、b2。

较高浓度的目的 DNA 是高连接效率的基础, 将胶条片段 a1、a2、b1、b2 分别进行电洗脱, 并用 λ DNA 标样检测回收浓度(图 1C), 测得 a1、a2、b1、b2 电洗脱后浓度均在 1–2 mg/L 左右, a2 浓度稍低, 也在 1 mg/L 左右, 基本达到大片段 DNA 克隆要求。

2.3 载体制备

载体的浓度及连接转化效率将直接影响文库构建的成败和质量, 高质量的载体是构建高质量文库的必备条件, 因此我们对载体进行了浓度和质量检测。经 λ DNA 标样检测克隆载体 pIndigoBAC536-S 的浓度约为 10 mg/L (图 2), 然后加甘油调整至载体的浓度为 6 mg/L, 甘油浓度 30%–40%之间, 储存在–80 °C 冰箱中备用。

为检测载体的质量, 将不同量的载体 pIndigoBAC536-S 与用同种酶(*Hind* III)酶解过的

λ DNA (30 mg/L)进行连接转化, 同时设置一个没有加入 λ DNA 的载体自连对照。结果显示, 自连检测反应涂布 100 μ L 转化产物的培养皿中, 蓝斑白斑基本没有, 均小于 5 个; 连接 λ DNA 的检测反应, 在 100 μ L 的连接体系中, 载体与 λ DNA 以 30 ng:60 ng 左右的质量比加入时, 白斑的数量最多, 涂布 100 μ L 转化产物达到 800 个以上, 此比例被确定为该批载体连接反应的最佳比例, 证明该批载体具有较高的质量, 可用于 BAC 文库构建。

2.4 BAC 文库构建和质量检测

将载体与 UV-2 *Hind* III DNA 片段 a1、a2、b1、b2 在 16 °C 中连接过夜, 连接产物灭活并脱盐后于 4 °C 保存。预转化结果显示, 两微升 a1、a2 两个片段连接产物的转化反应得到的白斑数量较多(a1>a2>1 200), 且蓝斑数较少, 每个反应随机挑取 20 个白色克隆进行插入片段检测分析, 均未见到空载体, a1 平均插入片段为 100 kb 左右, a2 平均插入片段为 130 kb 左右。而两微升 b1、b2 两个片段连接产物的转化反应得到的白斑数较少(b2<b1<400), 即便 b1、b2 平均插入片段较大, 但空载率也高, 为了保证文库的质量, 故选择较大片段的 a2 连接体系进行大量转化。共进行了 8 个转化反应, 平均每个转化得到 1 500 个克隆左右。将白斑挑拣到灌有冰冻培养基的 384 孔板中, 共挑拣 27 块 384 孔板 10 368 个克隆, 复制 2 个拷贝置于–80 °C 保存。

为获得整个文库的质量信息, 从文库中随机挑取了 168 个克隆抽提质粒, *I-Sce* I 酶解后经脉冲凝胶电泳进行插入片段检测分析, 在 168 个克隆中仅有一个空载, 空载率小于 1%。图 3 为部分克隆的电泳图谱, 从图 3 可以看出插入片段大小比较集中, 进而说明两次筛选比较成功。图 4 为检测的这 168 个克隆的统计分析结果, 可以看出插入片段大小多集中在 120–130 kb 之间, 插入

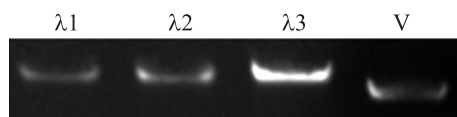


图 2 载体 pIndigoBAC536-S 浓度检测

Fig. 2 Concentration estimation for the vector pIndigoBAC536-S

注: λ 1、 λ 2、 λ 3 分别为 8、16、32 ng DNA 标样; V: 1 μ L pIndigoBAC536-S 载体。

Note: λ 1, λ 2, λ 3 are the DNA standards of 8, 16 and 32 ng respectively; V: 1 μ L pIndigoBAC536-S vector.

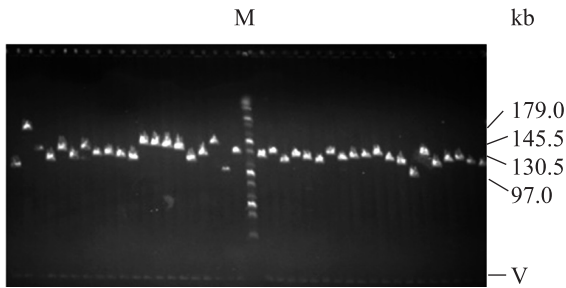


图3 UV-2 BAC 文库随机 BAC 克隆的插入片段检测
Fig. 3 Insert size estimation of randomly selected BAC clones of the UV-2 BAC library

Note: M: Middle range PFG marker; V: pIndigoBAC536-S vector (-7 kb).

片段较大或较小的均占少数, 通过统计分析得出该 168 个克隆的平均插入片段为 124.4 kb, 该文库覆盖 UV-2 基因组(以 35 Mb 计)的 36.8 倍。

3 讨论

稻曲病是一种严重的水稻真菌病害, 随着农业生产水平的提高, 如不能对稻曲病进行有效控制, 其发病率及发病范围必有增长趋势, 除造成水稻减产外, 还会严重影响稻米质量, 对人类健康构成威胁。从分子水平上开展稻曲病菌基础研

究及防控技术研究将有助于人们从根本上防治该病的发生。

本文成功构建了稻曲病菌 UV-2 的基因组 BAC 文库。基因组 BAC 文库构建技术的关键是载体和外源 DNA 的质量。本课题组在载体改良和制备等方面已取得丰富的经验^[14-15,18], 然而, 高质量基因组大分子 DNA 的制备对于不同生物难易程度差别很大。一般动物的基因组大分子 DNA 较易制备, 因此 BAC 文库构建也较容易。植物由于有细胞壁、蜡质、多酚物质等影响和叶绿体、线粒体 DNA 干扰, 核基因组大分子 DNA 制备比较困难。虽然真菌没有叶绿体干扰, 线粒体 DNA 也较小, 在 17-78 kb 之间^[19], 会在大片段 DNA 筛选过程中被筛选掉, 但有坚硬的细胞壁, 基因组小, 单位细胞的 DNA 含量低, 并且在真菌基因组 DNA 制备过程中, 还会受到来自真菌自身和培养基中多糖的影响, 即便同一个种不同菌株的真菌的大分子 DNA 制备方法也不尽相同, 所以, 真菌基因组大分子 DNA 制备非常困难。经过一段较长时间的摸索, 我们成功地利用

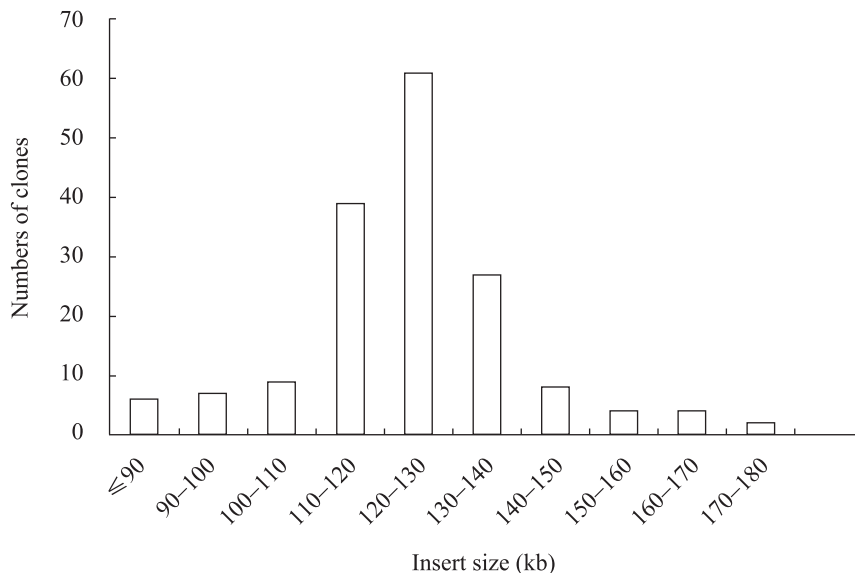


图4 UV-2 BAC 文库插入片段分析(共 168 克隆)
Fig. 4 Insert size analysis of the UV-2 BAC library (168 clones)

完全培养基培养, 找到基本适合该菌基因组大分子 DNA 制备的条件。

基因组文库, 特别是基于细菌人工染色体 (BAC) 的大片段插入文库已成为所有生物, 尤其是高等动植物在进行全基因组测序、物理图谱构建、染色体步查、基因克隆及基因表达分析的最好材料, 也是永久保存基因资源的最好方法之一。稻曲病菌 UV-2 BAC 文库平均插入片段较大 (124.4 kb), 覆盖该菌基因组的 36.8 倍, 空载率非常低, 完全可以保证今后进一步的基因鉴定等用途。该文库的成功构建, 将为深入开展稻曲病菌致病机制的研究提供基因组资源, 同时也为其它真菌基因组 BAC 文库的构建提供参考, 促进真菌基因组学的研究。

参 考 文 献

- [1] Koiso Y, Li Y, Iwasaki S, et al. Ustiloxins, antimetabolic cyclic peptides from false smut balls on rice panicles caused by *Ustilaginoidea virens*[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1994, 47(7): 765-773.
- [2] 姜慎, 唐春生, 谭志琼. 国内外稻曲病研究现状[J]. *热带农业科学*, 2010, 30(3): 62-66.
- [3] 黎毓干. 稻曲病研究初报[J]. *广东农业科学*, 1986, 4: 45-47.
- [4] 白元俊, 王疏, 刘晓舟, 等. 水稻稻曲病菌的毒素研究[J]. *辽宁农业科学*, 1997, 1: 30-33.
- [5] Nakamura K, Izumiyama N. Lupinosis in mice caused by ustiloxin and a crude extract of fungal culture of *Ustilaginoidea virens*[J]. *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology*, 1992, 35: 41-43.
- [6] Zhou YL, Fan JJ, Zeng CZ. Preliminary analysis of genetic diversity and population structure of *Ustilaginoidea virens*[J]. *Acta phytopathologica Sinica*, 2004, 34(5): 442-448.
- [7] 张君成, 张炳欣, 陈志谊, 等. 稻曲病菌分生孢子的生物学研究[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(1): 44-47.
- [8] 黄世文, 余柳青. 国内稻曲病的研究现状[J]. *江西农业学报*, 2002, 14(2): 45-51.
- [9] 李卫平, 王洪凯, 林福呈. 稻曲病菌厚垣孢子的萌发特性[J]. *浙江农业学报*, 2008, 20(4): 278-281.
- [10] 周永力, 谢学文, 王疏, 等. 采用 Nested-PCR 从田间和水稻植株上检测稻曲病菌[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(4): 542-545.
- [11] 张震, 杜新法, 柴荣耀, 等. 根癌农杆菌介导遗传转化稻曲病菌[J]. *中国水稻科学*, 2006, 20(4): 440-442.
- [12] 李燕, 刘永锋, 张荣胜, 等. 江苏省稻曲病菌的群体遗传结构[J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(2): 296-301.
- [13] Shizuya H, Birren B, Kim UJ, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(18): 8794-8797.
- [14] Luo M, Wing RA. An improved method for plant BAC library construction[J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2003, 236: 3-20.
- [15] Shi X, Zeng H, Xue Y, et al. A pair of new BAC and BIBAC vectors that facilitate BAC/BIBAC library construction and intact large genomic DNA insert exchange[J]. *Plant Methods*, 2011, 7: 33.
- [16] Guo M, Chen Y, Du Y, et al. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(2): e1001302.
- [17] Zhang H, Tang W, Liu K, et al. Eight RGS and RGS-like proteins orchestrate growth, differentiation, and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(12): e1002450.
- [18] Luo M, Wang YH, Frisch D, et al. Melon bacterial artificial chromosome (BAC) library construction using improved methods and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon Fusarium wilt (Fom-2)[J]. *Genome*, 2001, 44(2): 154-162.
- [19] Nouton KJ. Plant mitochondrial genomes: organization, expression and variation[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1988, 39: 503-532.