

# 利用水稻 BAC 克隆对 *Gm-2* 和 *Gm-6* 在药用 野生稻中的 FISH 定位

覃 瑞, 魏文辉, 宁顺斌, 金危危, 何光存, 宋运淳

(武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室 430072)

**摘要:** 采用栽培稻遗传图第 4 连锁群中与抗稻瘿蚊基因, *Gm-6* 和 *Gm-2* 等位的 RFLP 标记 RG214 和 RZ569 筛选出来的两个 BAC 克隆为探针, 对药用野生稻进行了荧光原位杂交物理定位。两个 BAC 克隆的大小分别为 50kb 和 86kb, 在 Cot-1DNA 封阻的情况下它们均被定位于药用野生稻第 4 染色体长臂, 与着丝粒百分距为  $72.33 \pm 4.40$ 、 $77.10 \pm 2.40$ , 信号检出率分别为 61.2% 和 59.5%。与此同时, 用 RG214 和 RZ569 对药用野生稻进行了杂交, 它们也被定位于药用野生稻第 4 染色体长臂, 与着丝粒百分距分别为  $74.18 \pm 2.62$  和  $78.23 \pm 2.31$ , 信号检出率分别为 8.3% 和 9.4%。BAC 克隆的 RFLP 标记探针杂交位置几乎一致, 这表明在栽培稻和野生稻中 RFLP 标记 RG214 和 RZ569 都在同一 BAC 克隆的大插入片段中, 药用野生稻与抗性基因 *Gm-6* 和 *Gm-2* 同源顺序就在第 4 染色体信号出现的相应位置。药用野生稻第 4 染色体的确定是根据 Jena 等(1994)和本研究的 RFLP 的杂交结果进行的。文中讨论了利用栽培稻 BAC 克隆对药用野生稻进行原位杂交物理作图的可行性等问题。

**关键词:** 药用野生稻; FISH; 物理定位; BAC 克隆

中图分类号: Q343.22 文献标识码: A 文章编号: 0578-1752(2001)01-0001-04

## *The Physical Location of Gm-2 and Gm-6 in O. officinalis with BAC-FISH Based on Comparative RFLP Map of Wild Rice, O. officinalis and Cultivated Rice, O. sativa.*

QIN Rui, WEI Wen-hui, NING Shun-bin, JIN Wei-wei, HE Guang-cun, SONG Yun-chun

(The Centre of Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract:** Rice BAC library is being used widely in rice genome research due to its distinctive advantages over other library systems. In this study, two rice BAC clones closely linked to rice gall midge resistance, *Gm-2* and *Gm-6*, were *in situ* hybridized to *Oryza officinalis* chromosomes. They were located on the long arm of chromosome 4 with FL 72.33% and 77.10% respectively and their FL were consistent with the selective marker of rice, RG214 and RZ569. The frequency of signal detection were 61.2% and 59.5%. Our study is based on comparative RFLP map of wild rice, *O. officinalis*, and cultivated rice, *O. sativa*.

**Key words:** *O. officinalis*; FISH; Physical location; BAC

野生稻是水稻种质资源中重要的部分, 在漫长的进化过程中, 由于复杂的地理环境和各种生态因素的作用, 形成了极其丰富的遗传多样性。野生稻具有栽培稻所不具有的优良性状, 通过有计划的考察、收集、筛选和鉴定, 已从野生稻中发掘出了抗病、抗

虫、耐冷、耐热、细胞质雄性不育及其它许多优异基因。野生稻中发掘出的基因具有抗性强、抗谱广、抗性稳定的特点。由于这些基因与产量性状密切相关, 对野生稻资源的研究正日益受到重视<sup>[1]</sup>。

水稻中的抗病基因与病原生物中的非致病基因

收稿日期: 2000-06-07

资助项目: 国家自然科学基金资助项目(39870423); 高等学校博士学科点专项研究基金(207980112)

作者简介: 覃 瑞(1972-), 男(土家族), 博士生, 从事植物分子细胞遗传学研究。宋运淳为通讯联系人, Tel: 027-87684505; E-mail: ycsong

@whu.edu.cn

存在着基因对基因的关系,抗性很容易由于致病基因的变化或新的致病基因的出现而丧失。为了维持栽培稻群体中的抗病水平,就要有源源不断的新的抗病基因的导入。实践证明野生稻是提供新的抗病基因的种质资源库。野生稻中抗虫、抗病和耐不良性环境材料检出的机率,一般比栽培稻高出几十倍<sup>[1]</sup>。我国有 3 种野生稻,即普通野生稻 (*Oryza ruffipogon* Griff)、疣粒野生稻 (*O. meyerana* Baill)、药用野生稻 (*O. officinalis* Wall)。其中药用野生稻主要分布在广东、广西、海南、云南 4 省(区)的 38 个县(市),属于 CC 染色体组型。我国的药用野生稻具有抗三化螟、褐飞虱、白背飞虱、稻瘿蚊、稻瘟病、白叶枯病和东格鲁病毒等多种病虫害的特性,是稻属抗性研究中的一种理想材料<sup>[2]</sup>。

药用野生稻属 CC 染色体组型,与栽培稻的染色体组型(AA)不同,稻属种间杂交常常遇到有性生殖障碍,严重地阻碍了遗传物质的转移交流。分子生物学已成为野生稻基因转移利用和研究中的一种必不可少的手段,并已成功地应用于野生稻杂种的鉴定、后代遗传组成的分析、外源 DNA 片段及其大小的检测、野生稻基因的标记定位和克隆<sup>[3]</sup>。

水稻连锁图具有分布均匀的标记,有包括抗稻瘟病、白叶枯病、黄萎病、绿叶蝉、褐飞虱和稻瘿蚊等较多基因,这些基因的 BAC (bacterial artificial chromosome) 克隆已于 1997 年用与基因等位的 RFLP 标记筛选出来。利用这些基因的 BAC 克隆对野生稻染色体进行原位杂交 (*in situ hybridization*),除增加对野生稻基因组结构的了解外,可以为对其进行分离与利用提供依据<sup>[4]</sup>。

本研究选用与抗稻瘿蚊基因 *Gm-2*、*Gm-6* 连锁的 RFLP 标记 RG214、RZ569 及其筛选出的 BAC 克隆 31E20、24E21 对药用野生稻进行原位杂交来确定 *Gm-2*、*Gm-6* 基因在染色体上的具体位置,并根据 Jena<sup>[5]</sup>的栽培稻与药用野生稻的分子比较遗传图,首次通过 BAC-FISH 确定了药用野生稻第 4 条染色体的核型。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料和染色体制片

供试材料为药用野生稻 (*Oryza officinalis*) 稻株 1589,由广东国家野生稻圃提供。染色体制片分别参照 Yan 等<sup>[6]</sup>和 Ren 等<sup>[7]</sup>的方法。

### 1.2 水稻 BAC 克隆及探针标记

供试 BAC 克隆为 24E21 (50kb)、31E20 (86kb),由 RFLP 标记 RG214(1.5kb)、RZ569(1.0kb)筛选得到,武汉大学遗传所杨代常博士提供。RG214、RZ569 由美国康奈尔大学 Bald 博士和中国水稻研究所郑康乐研究员提供。

用碱裂解法<sup>[8]</sup>抽提 BAC 克隆质粒和 RG214、RZ569 质粒。提纯的质粒 DNA 用切口平移法标记。50 $\mu$ l 反应液中含 dATP、dCTP、dGTP、biotin-11-dUTP、DnaseI、DNA 聚合酶 I 和 0.5 $\mu$ g 质粒探针 DNA,15 $^{\circ}$ C 下标记 1.5~3h 后加 5 $\mu$ l 0.2mol/L EDTA (pH8.0) 终止反应, Sepharose CL-6B (Sigma) 纯化,用加链亲和辣根过氧化物酶 (BRL, Life Technologies) 的点印记法检测标记效果。

### 1.3 原位杂交及检测

标记的探针的染色体杂交分别参阅 Song 等<sup>[9]</sup>和 Jiang<sup>[10]</sup>等程序稍加修改。所用杂交液含 50ng 标记的探针 DNA,50% 去离子甲酰胺,8% 硫酸葡聚糖,2 $\times$  SSC,0.5 $\mu$ g 鲑鱼精子 DNA,2 $\mu$ g 水稻 Cot-1DNA (100bp~1kb),Cot-1DNA 参见 Zwick<sup>[11]</sup>的程序制备,37 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交信号的荧光检测:42 $^{\circ}$ C 2 $\times$  SSC 漂洗 5m in,依次加入 10 $\mu$ g/ml FITC-Avidin (Sigma),5 $\mu$ g/ml Anti-avidin (Sigma),10 $\mu$ g/ml FITC-Avidin 37 $^{\circ}$ C 各 30m in,50 $\mu$ g/ $\mu$ l PI 复染,B $\times$ 60 型显微镜观察并拍照。

## 2 结果与分析

1994 年 Jena 用 149 个栽培稻基因组和 cDNA 的分子标记对药用野生稻作分子比较遗传图,发现其中 128 个分子标记在药用野生稻基因组中存在单一位点,并将相应的存在多个共同的分子标记的药用野生稻染色体编号与栽培稻染色体编号对应起来<sup>[5]</sup>。但在他的研究中并没有对药用野生稻的染色体核型作具体分析。药用野生稻第 4 染色体已检出 10 个与栽培稻第 4 染色体相同的分子标记<sup>[5]</sup>,RG214 是其中的一个。在我们的研究中,用 RG214 和由它筛选的 BAC 克隆作为供试探针,对检出信号的药用野生稻染色体的核型分析发现(图版-A、B、C),RL 值平均为  $7.30 \pm 0.14$  和  $7.40 \pm 0.07$ ,臂比为  $1.05 \pm 0.02$  和  $1.08 \pm 0.02$  没有观察到随体,属于中央着丝粒染色体。

利用 BAC 克隆 24E21、31E20 和 RG214、RZ569 作为探针对药用野生稻的原位杂交结果见表和图版-A~H。

表 探针 24E21、31E20、RG214 和 RZ569 在药用野生稻染色体上杂交信号的位置

Table The locations of hybridization signals in *O. officinalis* using 24E21, 31E20, RG214 and RZ569 as probes

探针 Probe	检出信号的 染色体臂 The arms detecting signals	臂比 Arm ratios	信号距着丝粒 平均百分距离 Average distance from the signal spots to the centromere	观察细胞总数 The total number of the cells observed	检出信号的 细胞数 The number of the cells detecting signals	检出率 Detection rate
24E21	L*	1.08±0.02**	72.33±4.40	67	41	61.2%
RG214	L	1.05±0.02	74.18±2.62	108	9	8.3%
31E20	L	1.03±0.04	77.10±2.40	89	53	59.5%
RZ569	L	1.04±0.02	78.23±2.31	128	12	9.4%

\* L: Long arm, \*\* 标准偏差. Standard deviation

从水稻遗传图已知 *Gm-6* 位于第 4 连锁群<sup>[12]</sup>。根据我们的实验结果, 由 BG214 筛选的 BAC 克隆 24E21 和 RG214 对药用野生稻 FISH 显示, 两者在第 4 号染色体长臂上检出了信号(图版-A、B、C), 信号与着丝粒百分距离分别为  $72.33 \pm 4.40$  和  $74.18 \pm 2.62$ , 信号检出率分别为 61.2% 和 8.3%。供试探针 RZ569 在遗传图中与 *Gm-2* 等位。用 RZ569 筛选的 BAC 克隆 31E20 和 RZ569 在药用野生稻中的 FISH 结果显示(分别见图版-E、F、G), 对信号点所在的染色体形态的分析结果与 24E21、RG214 的结果几乎一致, 从而确定它们也处于第 4 染色体上, 信号位于长臂, RZ569、31E20 信号与着丝粒百分距离分别为  $77.10 \pm 2.40$  和  $78.23 \pm 2.31$ , 信号检出率分别为 9.4% 和 59.5%。BAC 克隆的检出率远远高于 RFLP 探针(表), 而且在 BAC 克隆的 FISH 中检测到姊妹染色单体同时出现信号的双点(图版-A、B、E)。

### 3 讨论

在植物中, 现有的原位杂交技术主要用于对 DNA 重复序列和多拷贝基因家族作图<sup>[13]</sup>。植物单或低拷贝基因常为 1 至数 kb 的小片段 DNA, 其探针与靶 DNA 序列相遇的机会较小, 因此杂交信号检出率较低。而 BAC 克隆的外源片段一般为 100kb 左右<sup>[14]</sup>, 因此将 BAC 克隆与具有高灵敏度的 FISH 技术相结合(即 BAC-FISH), 有利于提高单拷贝的如抗性等功能基因的物理定位信号检出率, 大大促进植物基因组的研究<sup>[15]</sup>。目前运用该技术已将抗白叶枯病基因 *Xa-21*、棉花 rRNA 基因<sup>[16]</sup>, 抗稻瘟病基因 *Gm-2*, 抗绿叶蝉基因 *G1h* 和抗水稻黄萎病 *RTSV*<sup>[15]</sup>成功地定位到染色体上。在我们的实验中, 24E21、31E20 两个 BAC 克隆在药用野生稻染色体上的信号检出率(61.2% 和 52.7%) 远高于 RG214、RZ569 探针的水平(8.3% 和 9.8%)。BAC-FISH 已

成为植物基因组研究中一种重要技术。

此外, 每个 BAC 克隆可能包括较多的 DNA 片段, 从而决定了利用它作探针不仅是对单个基因, 而且可能是对多个基因或标记的物理作图。因此, 其结果还可以用于检测不同物种多个标记的同线性和它们分布区域的保守特点。在我们的研究中, BAC 克隆 24E21、31E20 只在第 4 染色体的长臂上的特定位置检测到信号点, 说明这两个栽培稻 BAC 克隆所含的 DNA 长片段或多个标记在药用野生稻第 4 染色体分布同线而且同区, 栽培稻的 BAC 克隆片段在药用野生稻中同样也是作为一个克隆片段存在。

1994 年 Jena 等通过绘制出的栽培稻(基因组 AA)与药用野生稻(基因组 CC)的比较分子图, 对同线性程度高的染色体采用相同的编号。例如药用野生稻具有较多与分布在栽培稻第 1 染色体上相同基因的染色体, 不管它的相对长度、臂比等形态如何, 都编号为第 1 染色体, 其余依次类推。在本研究中我们也沿用了 Jena 等这一研究思路, 选用它们定位在药用野生稻第 4 染色体上的分子标记之一 RG214 FISH 定位, 凡检出信号的药用野生稻染色体即认定为第 4 染色体, 随后再进一步分析这被认定的第 4 染色体的形态, 建立形态识别标记。这样的分析和染色体识别编号既有基因组成的依据, 也有形态的依据。与常规核型分析相比, 水平上显著地提高了一步, 而且这种分析结果有助于在同一个属中对不同种作比较研究, 特别是以水稻这一模式植物的基因组学为依据, 必将大大促进稻属和禾本科大遗传体系的发展。

致谢: 感谢日本 Kyushu 大学 Kurata 教授, 美国 Cornell 大学 M.c. Couch 教授, Wisconsin 大学 Jiang Jim ing 教授, 中国水稻研究所郑康乐研究员提供宝贵的资料 and 材料。

## References:

- [ 1 ] He G C. Combination of cell project and molecular biology—the efficacious way of utilization for wild rice resource[ J ]. Bulletin of Biology, 1998, 18(2): 41- 45. (in Chinese)  
何光存. 细胞工程与分子生物学相结合——野生稻优异种质资源利用的有效途径[ J ]. 生物工程进展, 1998, 18(2): 41- 45.
- [ 2 ] National wild rice resource investigation cooperation group. Chinese wild rice resource investigation [ J ]. Scientia Agricultura Sinica, 1984, 6: 1- 8. (in Chinese)  
全国野生稻资源考察协作组, 我国野生稻资源普查与考察[ J ]. 中国农业科学, 1984, 6: 1- 8.
- [ 3 ] Zhang S Z, Lu B R, Hong D Y. The application of in situ hybridization in *Oryza* [ J ]. Journal of Plant Classify, 1998, (1): 1- 12. (in Chinese)  
张寿洲, 卢宝荣, 洪德元. 原位杂交在稻属研究中的应用[ J ]. 植物分类学报, 1998, (1): 1- 12
- [ 4 ] Yang D C, Parco A, Nandi S, et al. Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library and identification of overlapping BAC clones with chromosome 4-specific RFLP markers in rice[ J ]. Theor. Appl. Genet. 1997, 95: 1147- 1154.
- [ 5 ] Jena K K, Khush G S, Kochert G. Comparative RFLP mapping of a wild rice, *Oryza officinalis*, and cultivated rice, *O. sativa*. Genome, 1994, 37(3): 382- 389.
- [ 6 ] Yan H M, Song Y C, Li L J, et al. Physical location of the rice *Gm-2*, *G1h* and *RTSV* genes by ISH of BAC clones[ J ]. J. Wuhan Univ. (Natural Science Edition), 1998, 3(2): 226- 230.
- [ 7 ] Ren N, Song Y C, Bi X Z, et al. The physical location of genes *cdc2* and *prh1* in maize( *Zea mays* L. ) [ J ]. Hereditas, 1997, 126: 211- 217.
- [ 8 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual[ M ]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 25- 26.
- [ 9 ] Song Y C, Gustafson J P, et al. The physical location of fourteen RFLP markers in rice ( *Oryza sativa* ) [ J ]. Theor. Appl. Genet. 1995, 90: 113- 119.
- [ 10 ] Jiang J, Gill B S, Wang G L, et al. Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes[ J ]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92: 4487- 4491.
- [ 11 ] Zwick S M, Hanson R E, Mcknight T D, et al. A rapid procedure for the isolation of Cot-1DNA from plants[ J ]. Genome, 1997, 40(1): 138- 142.
- [ 12 ] Causse M A, Theresa M F, Yang G C, et al. Saturated molecular map of rice genome based on interspecific backcross population[ J ]. Genetics, 1994, 138: 1251- 1274.
- [ 13 ] Jiang J, Gill B S. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first ten years[ J ]. Genome, 1994, 37(5): 717- 725.
- [ 14 ] Shizuya H, Brien B, Kim U J, et al. Cloning and stable maintenance of 300 kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector [ J ]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 8794- 8797.
- [ 15 ] Qin R, Wei W H, Song Y C. The application of BAC-FISH in plant genome research [ J ]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2000, 27(1): 20- 23. (in Chinese)  
覃瑞, 魏文辉, 宋运淳. BAC-FISH 在植物基因组研究中的应用[ J ]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(1): 20- 23.
- [ 16 ] Hanson R E, Zwick M S, Choi S, et al. Fluorescent *in situ* hybridization of a bacterial artificial chromosomes [ J ]. Genome, 1995, 38(4): 646- 651.