

# 利用基因组文库加速 Xa23 基因定位的染色体步移

王春连<sup>1 2</sup> 陈乐天<sup>3</sup> 曾超珍<sup>1 4</sup> 张群宇<sup>3</sup> 刘丕庆<sup>4</sup> 刘耀光<sup>3</sup> 樊颖伦<sup>1 2</sup> 章琦<sup>1</sup>  
赵开军<sup>1 2 5,\*</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院 作物科学研究所/农业部作物遗传育种重点实验室,北京 100081 ;<sup>2</sup>中国农业科学院 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程,北京 100081 ;<sup>3</sup>华南农业大学 生命科学学院,广东 广州 510642 ;<sup>4</sup>广西大学 农学院,广西 南宁 530005 ;<sup>5</sup>国际水稻研究所中国办事处,北京 100081 ; \* 通讯联系人, E mail zhaokj@mail .caas .net .cn)

## Chromosome Walking for Fine Mapping of Xa23 Gene Locus by Using Genomic Libraries

WANG Chun lian<sup>1 2</sup> , CHEN Le tian<sup>3</sup> , ZENG Chao zhen<sup>1 4</sup> , ZHANG Qun yu<sup>3</sup> , LIU Pi qing<sup>4</sup> , LIU Yao guang<sup>3</sup> , FAN Ying lun<sup>1 2</sup> , ZHANG Qi<sup>1</sup> , ZHAO Kai jun<sup>1 2 5,\*</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Crop Genetics & Breeding , Ministry of Agriculture ; Institute of Crop Sciences , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing 100081 , China ;<sup>2</sup> National Key Facility for Crop Resources and Genetic Improvement , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing 100081 , China ;<sup>3</sup> College of Life Science , South China Agricultural University , Guangzhou 510642 , China ;<sup>4</sup> Agricultural College , Guangxi University , Nanning 530005 , China ;<sup>5</sup> IRRI China Office , Beijing 100081 , China ; \* Corresponding author , E mail : zhaokj@mail .caas .net .cn)

Abstract : To develop closely linked markers for the rice bacterial blight resistance gene Xa23 , a TAC library of Minghui 63 and a PAC library of Guanglu ai 4 were screened using the 0.8 kb PCR product from rice near isogenic line CBB23 as probe . The probe DNA was amplified with the primer of the EST marker C189 that is linked to Xa23 gene with a genetic distance of 0.8 cM . Fifteen insert end fragments from the obtained seven positive TAC and PAC clones were isolated by enzyme digestion or TaqI PCR . RFLP Southern blotting analysis showed that seven of the 15 end fragments displayed polymorphism between CBB23 and the susceptible recurrent parent Jingang 30 . Consequently , individual plants from F<sub>2</sub> population of Jingang 30/CBB23 were further RFLP surveyed using the seven polymorphic end fragments 69B , 70N , 81N , 45B , 45N , 84N and 84B as probes . The results showed that 69B , 70N , 81N , 45B , 45N , 84N and 84B were linked to the Xa23 gene with genetic distances of 0.4 , 0.4 , 0.4 , 0.5 , 0.6 , 0.6 and 1.1 cM , respectively . However , BLASTN analysis against the genome sequence of Nipponbare showed that the physical distances between Xa23 and 69B , 70N and 81N were different even though the genetic distances were the same . The Xa23 gene locus was successfully fine mapped with the 7 end fragment markers . The applicability of this chromosome walking strategy for other crops was discussed .

Key words : rice bacterial blight ; resistance gene ; gene mapping ; TAC library ; PAC library ; chromosome walking

摘 要 : 用距离水稻抗白叶枯病基因 Xa23 0.8 cM 的 EST 标记 C189 扩增 Xa23 的近等基因系 CBB23 的基因组片段 (0.8 kb) 为探针 , 筛选水稻明恢 63 的 TAC 文库和广陆矮 4 号的 PAC 文库 , 对获得的 7 个阳性克隆用酶切法和 TaqI PCR 法进行末端片段分离 , 获得 15 个末端片段 , 用于感病亲本金刚 30 和抗病亲本 CBB23 之间的多态性检测 , 发现 7 个末端片段在双亲间有多态性 , 分别为 69B、70N、81N、45B、45N、84N 和 84B。用这些末端片段作 RFLP 标记 , 对金刚 30/CBB23 的 F<sub>2</sub> 群体进行检测和连锁分析 , 结果表明这些标记与 Xa23 的遗传距离依次为 0.4、0.4、0.4、0.5、0.6、0.6 和 1.1 cM。虽然 69B、70N 和 81N 与 Xa23 的遗传距离均为 0.4 cM , 但序列比对揭示 69B 与 70N 的物理距离为 35 kb , 与 81N 为 95 kb , 69B 距 Xa23 最近。三者与 Xa23 的遗传距离虽然相同 , 但物理距离存在很大差异。这些末端片段标记加密了 Xa23 基因一侧的遗传图谱 , 并使其遗传距离缩短到 0.4 cM , 加速了 Xa23 的定位进程 , 为 Xa23 的分离克隆奠定了重要基础。讨论了这种染色体步移方法的适用条件。

关键词 : 水稻白叶枯病 ; 抗性基因 ; 基因定位 ; TAC 文库 ; PAC 文库 ; 染色体步移

中图分类号 : Q943.2 ; S511.03 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-7216(2006)04-0355-06

水稻白叶枯病是困扰世界水稻生产的主要病害之一 , 不仅在亚洲 , 而且在美洲及非洲等地的产稻国家都有发生<sup>[1]</sup>。该病在我国每年都有不同程度的发生。由于病原菌通过伤口或水孔侵入维管束产生为害 , 药剂防治效果不佳 , 种植抗病品种被认为是水稻白叶枯病防治中最为经济有效的方法。

20 世纪 60 年代以来 , 国际上鉴定出水稻抗白叶枯病基因约 30 个。根据形态标记和分子标记已把有些抗病基因定位到不同的染色体上 , 如 Xa1、

Xa2、Xa12 和 Xa14 定位在第 4 染色体上<sup>[2,4]</sup> ; Xa3、Xa4、Xa10、Xa21、Xa22(t)、Xa23 和 Xa26(t) 定位在第 11 染色体上<sup>[3,5,8]</sup> ; Xa25(t) 定位在第 12 染色体上<sup>[9]</sup> ; Xa27(t) 定位在第 6 染色体上<sup>[10]</sup> ;

收稿日期 : 2005-12-30 ; 修改稿收到日期 : 2006-03-08。  
基金项目 : 农业部 948 项目 (2001-203) ; 国家 863 计划资助项目 (2002AA2Z1001-05, 2001AA211061)。  
第一作者简介 : 王春连 (1962 - ) , 女 , 副研究员 , 博士研究生。

*Xa29*(t) 定位在第 1 染色体上<sup>[11]</sup>。隐性抗病基因 *xa5* 和 *xa13* 分别定位在第 5 和第 8 染色体上<sup>[12-14]</sup>。其中 *Xa1*、*xa5*、*Xa21*、*Xa26* 和 *Xa27* 已被分离克隆<sup>[15-19]</sup>。

在已知的白叶枯病抗性基因中,被育种利用的并不多。我国籼稻尤其是杂交稻大部分利用的是 *Xa4* 基因,由于长期作为主体抗源,大部分品种出现感病化。近年各国竞相利用具有广谱抗性的 *Xa21* 基因,但有些国家已有 *Xa21* 抗性丧失的报道。*Xa23* 基因自 1987 年鉴定出对国内外鉴别菌系都表现为高抗,且完全显性、全生育期抗病以来,到目前仍保持稳定抗性,它的优异特性已引起育种家的重视,目前已被 30 多位育种家引用。

我们前期将 *Xa23* 定位在水稻第 11 染色体长臂上,且已获得 EST、SSR、RAPD 及 RFLP 等分子标记,将 *Xa23* 框在遗传图距 2.1 cM 之间<sup>[20-21]</sup>。为了克隆 *Xa23* 基因,需要更近、更密集的分子标记。而 *Xa23* 基因所在的 2.1 cM 染色体区段,可利用的分子标记非常有限,这一区域在国际水稻基因组计划测序草图中长期是一个 Gap,限制了我们借用国际水稻基因组图谱和序列资料寻找更近的连锁标记。在此情况下,本研究通过利用不同水稻品种的大片段基因组文库进行染色体步移获得了与 *Xa23* 更近的连锁标记,为该基因的克隆打好基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 文库、筛选文库探针及定位群体

所用的大片段基因组文库为水稻明恢 63 的 pYLTAC27 文库和水稻广陆矮 4 号的 pYLPAC3 文库<sup>[22]</sup>均由华南农业大学刘耀光博士提供。筛选文库的探针为 EST 标记 C189 引物扩增 CBB23 的回收产物,来自本实验室的前期工作<sup>[21]</sup>。作图群体为 *Xa23* 基因的近等基因系 CBB23 与轮回亲本金刚 30 的 F<sub>2</sub> 分离群体,共有 2562 个单株,其中抗病植株 1928 株,感病单株 634 株。抗性鉴定表明,植株抗感分离比严格符合 3:1。根据我们前期对 571 个感病单株的分析,采用 *Xa23* 基因两侧发生交换的感病重组个体 95 株,进行 RFLP 分析。

### 1.2 TAC、PAC 文库的筛选

将水稻明恢 63 的 TAC 文库、广陆矮 4 号的 PAC 文库的高密度膜放入装有预杂交液的杂交管中,在杂交炉中 (65℃) 进行预杂交。所用探针用 <sup>32</sup>P-dCTP (北京亚辉公司产品) 随机标记,经碱变性后加到杂交液中,65℃ 下过夜 (14~16 h),杂交后

回收杂交液于另一杂交管中备用。分别用 2×SSC/0.1% SDS、1×SSC/0.1% SDS、0.5×SSC/0.1% SDS 各洗膜 20 min (65℃),用保鲜膜包好,并压在分子磷屏中,根据所测杂交信号的强弱确定压膜的时间。用 BIO-RAD FX 成像系统扫描,选择信号强的阳性克隆进行扩大培养,用碱裂解法提取 TAC、PAC 阳性克隆质粒 DNA, *Hind* III 酶切检测插入片段大小。

### 1.3 TAC、PAC 插入片段末端的分离

用如下两种方法获得阳性克隆的末端片段。

#### 1.3.1 酶切法 (质粒拯救法)

把阳性克隆的质粒 DNA 分别用距离外源插入片段左右两端较近的、在载体上只有单一酶切位点的 *Bam*H 和 *Not* I 进行酶切过夜,取少量 (量多易于外源片段自连接) 酶切产物在 T4 连接酶的作用下连接,连接产物转化到 DH10B 感受态细胞中,涂布在具有卡那霉素 (50 μg/mL) 的 LB 培养基上,37℃ 下培养,挑取单菌落。扩大培养后用碱裂解法提取质粒 DNA,用 *Hind* III / *Bam*H、*Hind* III / *Not* I 双酶切,0.8% 凝胶电泳,载体与末端片段分离,用凝胶回收试剂盒分别回收左右两个末端片段作为探针待用。

#### 1.3.2 *Tai*I PCR 法

用酶切方法不能得到末端片段的阳性克隆,用 *Tai*I PCR 法<sup>[23-24]</sup>扩增并分离阳性克隆的末端片段,回收末端片段作为探针待用。针对 pYLTAC27 载体的 R 末端特异引物为 R1、R2 和 R3; L 末端特异引物为 L1、L2 和 L3,其序列见文献 [22]。采用的任意简并引物为 AD2: 5'-AGTGNA GAANCAAAGG 3', AD2a: 5'-NGTCGA (G/C) (A/T) GANA (A/T) GAA 3', AD2b: 5'-NGTCGA (G/C) (A/T) GANA (A/T) GTT-3', AD2c: 5'-NGTCGA (G/C) (A/T) GANA (A/T) GAG 3', AD3: 5'-CATCGNCNGANACGAA 3'。

### 1.4 亲本及群体 DNA 膜的制备

将金刚 30、CBB23 基因组 DNA 用 8 种限制性内切酶 (*Bam*H、*Bgl*I、*Dra*I、*Eco*R、*Eco*RI、*Hind*III、*Pst*I、*Sca*I) 酶切 12 h,低电压下电泳。电泳后用碱法 (0.4 mol/L NaOH) 将 DNA 转移到 Hybond N<sup>+</sup> 尼龙膜上,转移结束后用 2×SSC 漂洗,紫外交联后用保鲜膜包好,4℃ 下保存备用。金刚 30 与 CBB23 的 F<sub>2</sub> 单株 DNA 膜制备同上。

### 1.5 末端片段标记筛选

将酶切法和 *Tai*I PCR 法获得的末端片段 DNA

用  $-^{32}\text{P}$  dCTP 随机标记作为探针，Southern 杂交亲本膜(方法与筛选 TAC、PAC 文库高密度膜相同)，亲本间有多态性的末端片段用于检测  $F_2$  代群体。

1.6 末端片段标记与 *Xa23* 基因的连锁分析

将  $F_2$  单株的 Southern 带型转换为字母形式。金刚 30 带型赋予“A”，CBB23 带型赋予“B”，杂合带型赋予“H”。用 Mapmaker 3.0 软件进行基因和分子标记位点的连锁分析，采用 Kosambi 函数将重组值转换为遗传图距(Centimorgan, cM)。

2 结果与分析

2.1 TAC、PAC 文库的筛选

用 C189 引物扩增 CBB23 DNA 的回收产物(0.8 kb)为探针，筛选明恢 63 的 TAC 文库，共得到 14 个阳性克隆，分别为 30D6、35J12、40L5、40L6、35N12、40N2、42F15、44N2、58K4、71M32、90L18、45G1、34I1、44M24。将这 14 个克隆提取质粒 DNA，用 *Hind* 酶切，电泳检测插入片段大小。同样方法筛选广陆矮 4 号的 PAC 文库得到 3 个阳性克隆：66M23、77O11、37K24(图略)。用 C189 引物扩增上述 17 个阳性克隆(图 1)，有 6 个克隆为真正的阳性克隆，分别为 90L18、45G1、34I1、66M23、77O11、37K24。

2.2 末端片段为探针筛选亲本多态性及  $F_2$  群体

根据酶切指纹图谱检测各个克隆的差异及插入片段的大小，先选择 2 个克隆(45G1 和 90L18)进行末端片段 DNA 的分离。用酶切法获得 TAC 克隆 45G1 的 2 个末端片段 45B(*Bam*H 酶切)和 45N(*Not* 酶切)，用 *Not* 酶切 90L18 克隆得到 90N，用 *Bam*H 酶切得到 90B(表 1)。将这 4 个末端片段经同位素标记后进行亲本间多态性筛选，45B 杂交亲本膜，4 种内切酶(*Bam*H、*Bgl*I、*Eco*R、*Pst*I)在双亲之间有多态性，45N 有 5 种内切酶在

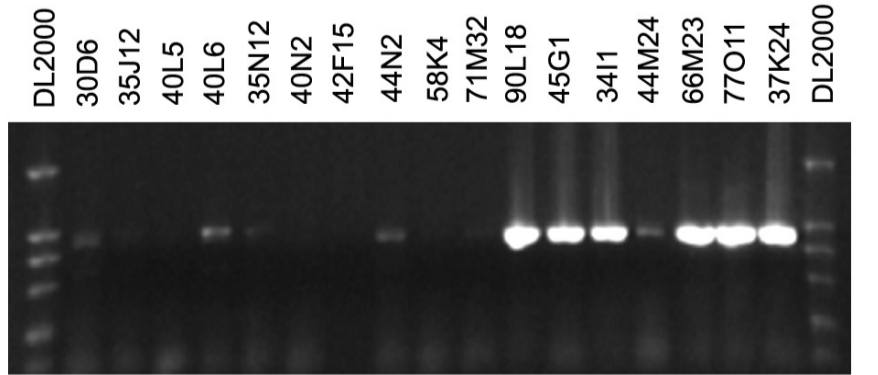


图 1 引物 C189 扩增 TAC、PAC 克隆

Fig.1 PCR test of TAC/PAC clones using primers of EST marker C189 .

双亲之间有多态性，90N 和 90B 在双亲之间没有多态性。

用 45B Southern 杂交  $F_2$  代 95 个感病单株，有 5 个植株与 CBB23 带型相同，说明有 5 个植株发生了交换(图 2)，占总感病植株的 0.86%。用 45N Southern 杂交  $F_2$  代单株，有 6 个感病植株与 CBB23 带型相同，说明有 6 个植株发生了交换，占总感病植株的 1.1%(图略)。在这 6 个植株中有 5 个与 45B 的交换植株相同。理论上交换个体越少遗传距离越近，说明 45B 标记距 *Xa23* 基因的距离较近。

2.3 再次染色体步移，实现多个末端标记加密遗传图谱

为了找到更多、跨越更远的 TAC 或 PAC 克隆，选择前述 6 个克隆 90L18、45G1、34I1、66M23、77O11、37K24，取相同浓度的 DNA，分别用 *Hind* 酶切，电泳后去除载体带，余下部分混在一起回收做探针，再次筛选前述 TAC、PAC 文库，经过验证，获得 TAC 克隆 3 个：81B22、84J7、70M12；PAC 克隆 2 个：66B14、69B15。用酶切法分别获得 81B22、84J7 的两侧末端片段：81B、81N 和 84B、84N；用 *Bam*H 酶切 66B14 克隆得到 2 个末端片段分别为 66B1(2 kb)、66B2(5 kb)，用 *Not* 酶切得到 1 个末端片段 66N(3 kb)；用 *Bam*H 酶切 69B15 得到 1 个末端片段为 69B，用 *Not* 酶切得到 2 个末端片段分别为 69N1(1 kb)和 69N2(5 kb)。70M12 用酶切方法没能得到末端片段，所以用 *Tai*I PCR 方法扩增 70M12，用特异引物与任意简并引物组合，得到 750 bp 的扩增产物，经验证该片段位于 70M12 的 R 末端，命名为 70N(表 1)。

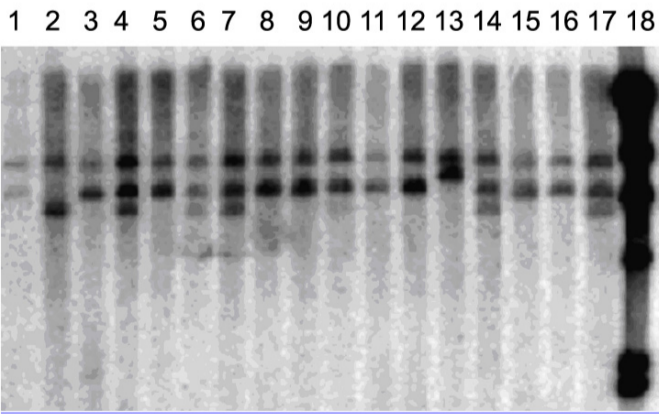


图 2 末端片段标记 45B 在  $F_2$  群体中与 *Xa23* 基因的连锁分析  
Fig.2 Co segregation between end fragment 45B and *Xa23* in  $F_2$  population .

1 - 金刚 30；2 - CBB23；3 ~ 17 - 感病的  $F_2$  群体；18 - *Hind*；4, 6, 7, 14, 17 - 重组个体。

Lane 1, Jingang 30；Lane 2, CBB23；Lanes 3 to 17, Susceptible  $F_2$  population；Lane 18, - *Hind*；Lanes 4, 6, 7, 14, 17, Recombination plants .

表 1 15 个末端片段列表

Table 1 .End fragments of positive clones from TAC ,PAC libraries .

末端编号 Code	来自克隆 Clone	获得方法 Method	双亲多态性 Polymorphism between parents
45B	45G1(TAC)	<i>Bam</i> H 酶切克隆 The clone digested by <i>Bam</i> H	+
45N	45G1(TAC)	<i>Not</i> 酶切克隆 The clone digested by <i>Not</i>	+
90B	90L18(TAC)	<i>Bam</i> H 酶切克隆 The clone digested by <i>Bam</i> H	-
90N	90L18(TAC)	<i>Not</i> 酶切克隆 The clone digested by <i>Not</i>	-
81B	81B22(TAC)	<i>Bam</i> H 酶切克隆 The clone digested by <i>Bam</i> H	-
81N	81B22(TAC)	<i>Not</i> 酶切克隆 The clone digested by <i>Not</i>	+
84B	84J7(TAC)	<i>Bam</i> H 酶切克隆 The clone digested by <i>Bam</i> H	+
84N	84J7(TAC)	<i>Not</i> 酶切克隆 The clone digested by <i>Not</i>	+
66N	66B14(PAC)	<i>Not</i> 酶切克隆 The clone digested by <i>Not</i>	-
66B1	66B14(PAC)	<i>Bam</i> H 酶切克隆 The clone digested by <i>Bam</i> H	-
66B2	66B14(PAC)	<i>Bam</i> H 酶切克隆 The clone digested by <i>Bam</i> H	-
69B	69B15(PAC)	<i>Bam</i> H 酶切克隆 The clone digested by <i>Bam</i> H	+
69N1	69B15(PAC)	<i>Not</i> 酶切克隆 The clone digested by <i>Not</i>	-
69N2	69B15(PAC)	<i>Not</i> 酶切克隆 The clone digested by <i>Not</i>	-
70N	70M12(TAC)	Tail PCR 方法 Tail PCR amplification done	+

将上述未进行多态性筛选的末端片段全部进行亲本多态性筛选 ,其中 81N 末端片段标记杂交亲本膜 ,全部 8 种限制性内切酶均在双亲之间表现出多态性。另外 70N、84B、84N、69B 在双亲间有多态性 ,其余无多态性 (表 1)。用这 5 个有多态性的末端片段标记筛查 F<sub>2</sub> 的 95 个感病植株。84B 杂交 95 个感病植株共有 3 个感病植株与 CBB23 带型相同 , 7 个感病植株均有双亲带型即杂合型 ,交换个体占总感病植株的 1 .75 %。而用 84N 杂交 95 个感病植株有 6 个感病植株均有双亲带型 ,为杂合带型 , 交换个体占总感病植株的 1 .1 %。84J7 克隆的两个末端片段发生的交换个体数多于 45B ,说明该克隆向远离 *Xa23* 方向步移。

而 70N、81N 和 69B 分别杂交 F<sub>2</sub> 代的 95 个感病植株 ,其中 4 个感病单株都有双亲带型 ,即杂合型 ,说明 4 个感病单株在这 3 个末端片段标记与 *Xa23* 之间都发生了交换 ,交换个体占总感病植株的 0 .7 % ,而且发生交换的个体相同 (图 3 只示出 81N 末端片段标记的杂交带型)。结果表明 ,这 3 个末端片段标记与 *Xa23* 之间发生交换的单株数比以前定位的所有标记发生的交换单株数都少 ,因此标记在向 *Xa23* 方向步移。

用 Mapmaker 3 .0 软件进行连锁分析表明 , 70N、81N 和 69B 末端片段标记距 *Xa23* 基因最近 , 遗传距离为 0 .4 cM ,在 C189 标记基础上步移了 0 .4 cM。在前期定位中 ,*Xa23* 基因与着丝粒之间的标记较少 ,只有 1 个 EST 标记 C189 和 1 个 RAPD 标记 RpdH5 ,而这 7 个末端标记加密了这一

侧遗传图谱 (图 4)

2 .4 遗传距离转化为物理距离

在我们完成上述末端片段标记定位的时候 ,国际水稻基因组计划也基本完成 C189 与 RM206 标记之间的日本晴 DNA 测序 ,因此将与 *Xa23* 基因遗传距离较近的末端片段 70N、81N 和 69B 进行测序 ,登陆 GenBank ,BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html>) 比对它们在染色体上的位置。81N 的部分序列与日本晴的一个 BAC 克隆的一段序列同源 ,70N 也在这个克隆上 , 两者的物理距离相差 60 kb。而 69B 在日本晴的

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

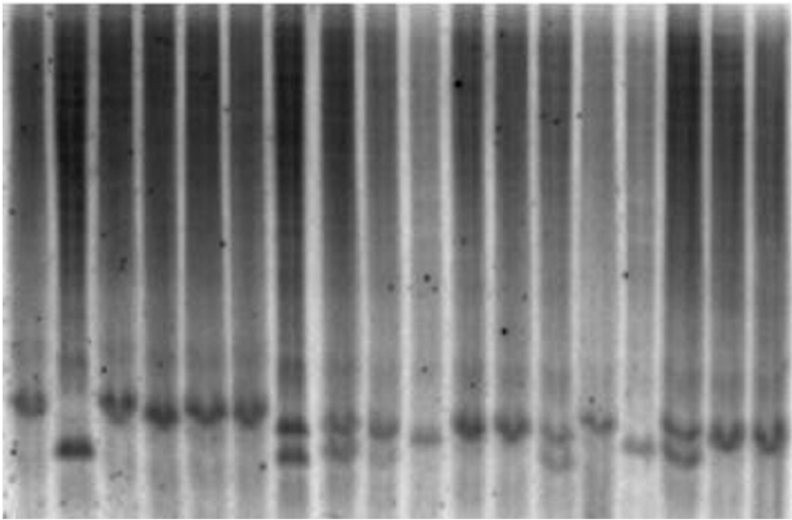


图 3 末端片段标记 81N 在 F<sub>2</sub> 代群体中与 *Xa23* 基因的连锁分析

Fig 3 Co segregation between end fragment 81N and *Xa23* in F<sub>2</sub> population .

1 - 金刚 30 ; 2 - CBB23 ; 3 ~ 18 - 感病的 F<sub>2</sub> 群体 ; 7、8、13、16 - 重组个体。

Lane 1 , Jingang 30 ; Lane 2 , CBB23 ; Lanes 3 to 18 , Susceptible F<sub>2</sub> population ; Lanes 7 , 8 , 13 , 16 , Recombination plants .

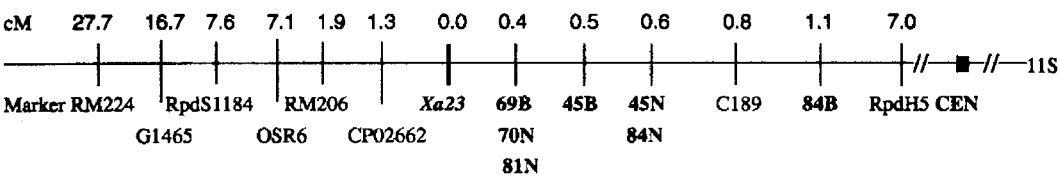


图 4 水稻抗白叶枯病基因 *Xa23* 的连锁遗传图谱  
Fig. 4. Genetic linkage map flanking rice bacterial blight resistance gene *Xa23*.  
新标记用黑体字表示。CEN—着丝粒；11S—第 11 染色体的短臂。

New markers identified in this study are shown in boldface. CEN, Centromere; 11S, Short arm of chromosome 11.

另一个 BAC 克隆上,与 81N 相差 95 kb。结果表明,虽然这 3 个末端片段的遗传距离相同(图 4),但他们的物理距离相差很大,69B 距离 *Xa23* 基因最近。

3 讨论

3.1 利用相关基因组文库加速 *Xa23* 的定位进程

基因组 DNA 大片段插入文库是基因图位克隆 (map-based cloning) 的基础,并为物理作图提供了保障。由于不同品种或近缘物种具有 DNA 序列的保守性,在分离克隆某些基因时,就可以利用与目标性状连锁的标记筛选其他品种甚至相关物种的基因组大片段文库,通过染色体步移获得更紧密的连锁标记。本研究是在 *Xa23* 基因所在区域已无其他分子标记可用,而且这一区域早期在国际水稻基因组计划测序草图中长期是一个 Gap,无法利用序列资料寻找标记的情况下,利用与 *Xa23* 基因较近的分子标记 C189 扩增 CBB23 的 DNA 片段为探针,筛选水稻明恢 63 的 TAC 及广陆矮 4 号的 PAC 文库,分离大片段阳性克隆末端片段,以这些末端片段为标记进行精细定位,获得了与 *Xa23* 基因紧密连锁的标记,并由原来的 0.8 cM 缩小到 0.4 cM,实现了染色体步移,加密了这一侧的遗传图谱,为 *Xa23* 基因的克隆打下了重要的基础。

3.2 遗传距离相同而物理距离不同的原因

本研究中,70N、81N 和 69B 这 3 个末端片段与 *Xa23* 基因之间的交换重组个体数相同,所以计算出的遗传距离均为 0.4 cM,但将这 3 个序列比对本晴的基因组序列时,发现 69B 和 70N、81N 的物理距离分别为 35 kb 和 95 kb,即与 *Xa23* 基因的物理距离不同。这是因为遗传距离是根据标记与目的基因之间发生交换重组个体数计算的遗传单位。而物理距离是标记与目的基因之间相隔的 DNA 碱基数。由于作图群体大小的限制,有时在两个相距一定物理距离的标记之间没有发生交换重组,于是计

算出的两个标记与目的基因之间的遗传距离一样,但两个标记与目的基因的物理距离是不同的。

3.3 利用相关基因组文库的策略和方法

本研究采用经典的菌落杂交法筛选文库。为了避免假阳性,将筛选文库的探针杂交液回收到另一管中,待检测出阳性克隆等对它进行指纹分析检测插入片段大小和指纹模式后转膜,再用回收的探针进行二次杂交,检测出真正的阳性克隆,避免假阳性的干扰,减小后期获得末端片段的工作量,并且不用重新标记探针,既节约又省时。如果有特异的 PCR 标记,也可对初筛出的阳性克隆进行 PCR 验证,去除假阳性。本研究在得到阳性克隆后,先对 2 个 TAC 克隆进行末端片段分离。因为获得一个克隆末端片段要通过酶切去除大部分外源插入片段、连接、转化、质粒提取、再酶切等一系列步骤,因此,在确信获得的阳性克隆末端片段适合作为标记,又证明向 *Xa23* 基因逼近以后,用所得到的 6 个阳性克隆去除载体序列,然后混在一起作为探针再次筛选文库。目的是早期不用获得所有克隆的末端,减小了工作量,后期用多个克隆筛选扩大了范围,这样获得不同位置、不同大小的克隆,得到 7 个不同位置的末端片段,最终加密了 *Xa23* 遗传连锁图谱。

3.4 利用相关基因组文库同样适合其他物种

对于基因组测序未完成的物种,或在含目的基因的大片段基因组文库不可得的情况下,本研究采用的方法是非常有用的。尤其对于基因组大的植物,如小麦、玉米、大豆等要完成基因组测序很困难,可利用的标记非常有限,可利用其他相关文库寻找标记,进行染色体步移,实现目的基因精细定位甚至克隆。

参考文献:

[1] Mew T W. Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. *Ann Rev Phytopathol*, 1987, 25: 359-382.

- [2] Ogawa T , Khush G S . Major genes for resistance to bacterial blight in rice//Bacterial Blight of Rice . Manila , Phillipines : IRRI , 1989 : 177- 192 .
- [3] Yoshimura S , Yoshimura A , Saito A , et al . RFLP analysis of introgressed chromosomal segments in three near isolines of rice for bacterial blight resistance genes *Xa1* , *Xa3* and *Xa4* . *Jpn J Genet* , 1992 , 67 : 29- 37 .
- [4] 谭震波 , 章 琦 , 朱立煌 , 王春连 . 水稻抗白叶枯病基因 *Xa14* 在分子标记连锁图上的定位 . 遗传 , 1998 , 20(6) : 30- 33 .
- [5] Ronald P C , Albano B , Labien R , et al . Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight resistance locus , *Xa21* . *Mol Gen Genet* , 1992 , 236 : 113- 120 .
- [6] Lin X H , Zhang D P , Xie Y F , et al . Identifying and mapping a new gene for bacterial blight resistance in rice based on RFLP markers . *Phytopathology* , 1996 , 86 : 1156- 1159 .
- [7] 章 琦 , 赵炳宇 , 赵开军 , 等 . 普通野生稻抗水稻白叶枯病 (*Xanthomonas oryzae* pv . *oryzae*) 新基因 *Xa23(t)* 的鉴定和分子标记定位 . 作物学报 , 2000 , 26(5) : 536- 542 .
- [8] Yang Z , Sun X , Wang S , et al . Genetic and physical mapping of a new gene for bacterial blight resistance in rice . *Theor Appl Genet* , 2003 , 106 : 1467- 1472 .
- [9] Chen H , Wang S , Zhang Q . A new gene for bacterial blight resistance in rice located on chromosome 12 identified from Minghui 63 , an elite restorer line . *Phytopathology* , 2002 , 92 : 750- 754 .
- [10] Gu K , Tian D , Yang F , et al . High resolution genetic mapping of *Xa27(t)* , a new bacterial blight resistance gene in rice , *Oryza sativa* L . *Theor Appl Genet* , 2004 , 108 : 800- 807 .
- [11] 谭光轩 , 任 翔 , 翁清妹 , 等 . 药用野生稻转育后代一个抗白叶枯病新基因的定位 . 遗传学报 , 2004 , 31(7) : 724- 729 .
- [12] Blair M W , McCouch S R . Microsatellite and sequence tagged site markers diagnostic for the rice bacterial leaf blight resistance gene *xa5* . *Theor Appl Genet* , 1997 , 95 : 174- 184 .
- [13] Zhang G , Angeles E R , Abenes M L P . RAPD and RFLP mapping of the bacterial blight resistance gene *xa13* in rice . *Theor Appl Genet* , 1996 , 93 : 65- 70 .
- [14] Sanchez A C , Ilag L L , Yang D , et al . Genetic and physical mapping of *xa13* , a recessive bacterial blight resistance gene in rice . *Theor Appl Genet* , 1999 , 98 : 1022- 1028 .
- [15] Song W Y , Wang G L , Chen L L , et al . A receptor kinase like protein encoded by the rice disease resistance gene , *Xa21* . *Science* , 1995 , 270(5243) : 1804- 1806 .
- [16] Yoshimura S , Yamanouchi U , Katayose Y , et al . Expression of *Xa1* , a bacterial blight resistance gene in rice , is induced by bacterial inoculation . *PNAS* , 1998 , 95(4) : 1663- 1668 .
- [17] Sun X , Cao Y , Yang Z , et al . *Xa26* , a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv . *oryzae* in rice , encodes an LRR receptor kinase like protein . *Plant J* , 2004 , 37(4) : 517- 527 .
- [18] Lyer A S , McCouch S R . The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance . *MPMI* , 2004 , 17(12) : 1348- 1354 .
- [19] Gu K Y , Yang B , Tian D S , et al . *R* gene expression induced by a type effector triggers disease resistance in rice . *Nature* , 2005 , 435 : 1122- 1125 .
- [20] 潘海军 , 王春连 , 赵开军 , 等 . 水稻抗白叶枯病基因 *Xa23* 的 PCR 分子标记定位及辅助选择 . 作物学报 , 2003 , 29(4) : 501- 507 .
- [21] 王春连 , 戚华雄 , 潘海军 , 等 . 水稻抗白叶枯病基因 *Xa23* 的 EST 标记及其在分子育种上的利用 . 中国农业科学 , 2005 , 38(10) : 1996- 2001 .
- [22] Liu Y G , Liu H M , Chen L T , et al . Development of new transformation competent artificial chromosome vectors and rice genomic libraries for efficient gene cloning . *Gene* , 2002 , 282 : 247- 255 .
- [23] Liu Y G , Robert F . Thermal asymmetric interlaced PCR : automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking . *Genomics* , 1995 , 25 : 647- 681 .
- [24] Liu Y G , Wang N . Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asymmetric interlaced PCR . *Plant Mol Biol Rep* , 1998 , 16 : 175- 181 .