

水稻类病变坏死突变基因的 RAPD 标记

彭卫欣^{1,2,3}, 刘国庆¹, 刘国振^{1,2}, 朱立煌¹, 谢晓亮³

(1 中国科学院遗传研究所, 北京 100101; 2 河北农业大学, 河北 保定 071001;

3 河北省农林科学院经济作物研究所, 河北 石家庄 050051)

摘要: 中粳 3037 诱变得到新的类病变坏死突变体 Sp1801, 以粳稻品种 02428 为父本与其杂交构建分离群体, 并利用 RAPD 技术对此突变相关基因进行了遗传连锁分析, 引物 OPI 11 和 OPL 03 扩增的稳定的差异片段与突变性状紧密连锁, 两标记与目的基因的遗传距离分别为 0.6 cM 和 5.6 cM, 并且两差异片段分别为 556 bp 和 944 bp, 因此 OPI₁₁₋₅₅₆ 和 OPL₀₃₋₉₄₄ 可以作为此突变基因的 RAPD 标记。序列同源性分析表明, OPI₁₁₋₅₅₆ 与一个抗稻瘟病基因 *pib* 有高度同源性。

关键词: 水稻; 类病变坏死突变体; RAPD 标记

中图分类号: S511.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)01-0005-04

The RAPD Marker of Mutant Gene of Rice Disease Lesion Mimic

PENG Wei-xin^{1,2,3}, LIU Guo-qing¹, LIU Guo-zhen^{1,2}, ZHU Li-huang¹, XIE Xiao-liang³

(1. Institute of Genetics Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 3. Institute of Industrial Crops, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: Sp1801 was a new disease lesion mimic mutant from Zhongxian 3037. It was hybridized with 02428 and the segregation population was structured. It was analyzed by means of RAPD technique. OPI₁₁₋₅₅₆ and OPL₀₃₋₉₄₄ were identified closely linked with the mutant gene with genetic distance of 0.6 cent Morgan (cM) and 5.6 cent Morgan (cM) respectively. Analysis of sequence homology shown that OPI₁₁₋₅₅₆ was highly homologous with *pib*, gene resistant to rice blast.

Key words: Rice, Disease lesion mimic, RAPD marker

在植物中, 在没有明显的逆境、损伤或病原物侵染时就能自发的形成细胞死亡, 在叶片上形成坏死斑, 其症状与病原物侵染后形成的坏死斑非常相似, 这种突变体被称为类病变坏死突变体 (disease lesion mimic)。这种突变体是研究超敏反应 (hypersensitive response) 的机理及激活机制等的有利工具, 对揭示植物的抗病反应机制, 增加植物的广谱抗性具有重要意义。这种突变体在植物中广泛存在, 目前在拟南芥、玉米、大麦、高粱、大豆及水稻中已发现许多这样的材料^[1~6]。在水稻中, 自 20 世纪 70 年代早期发现第一个类病变坏死突变体以来, 已发现近百种

类似的突变体, 目前已进行突变体相关基因定位的只有 10 个左右, 且大多数是作为标志性状定位在传统的遗传图谱上^[7]。程祝宽^[8] 1998 年在籼稻中发现了一个新的水稻类病变坏死突变体, 该突变体的显著特征是, 在水稻叶片上表现有褐色的坏死斑, 开始时坏死斑很小, 随着植株的生长, 斑点的数目随之增大, 并不断扩大, 最后使叶片枯死, 初步的遗传学分析表明该性状是由隐性单基因控制, 本实验室利用 SSR 标记对此突变基因做了染色体定位。

近年来植物分子标记研究的发展十分迅速, 已渗透到生物研究的各个领域, 在多种 DNA 分子标记

收稿日期: 2002-06-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39880020)

作者简介: 彭卫欣 (1974-), 女, 河北定州人, 硕士, 主要从事遗传育种研究工作。

技术中, RAPD 标记因其操作简便、不使用同位素和对模板 DNA 要求不高等优点而被越来越多的研究者采用。本研究利用 RAPD 标记对此突变基因进行分析, 试图找到与目的基因连锁的 RAPD 标记。

1 材料和方法

1.1 试验材料

Sp1801 由中粳 3037 经 Co^{60} 辐射诱变得到, 由扬州大学农学院程祝宽提供, 以 Sp1801 为母本, 02428 为父本配组杂交, 共获得 F_1 植株 3 株, F_1 植株表现完全正常, 全生育期内没有坏死斑出现, 说明突变是一个隐性性状, 受隐性基因控制。在上述两株 F_1 自交, 在 F_2 群体出现了严重的偏分离现象, 两个 F_2 群体中野生型与突变体的分离比例分别为 314: 2 和 316: 2。将其中第一个 F_2 群体中能正常结实的种子分单株混收, 种植了 137 个株系, 在这些株系中, 70 个株系出现了野生型与突变型性状的分离, 分离比例为 413: 1 (3 139: 735)。选取 F_3 植株中野生型与突变型植株分离比例接近 3: 1 的群体 (132: 43) 作为定位群体。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 水稻总 DNA 的提取参照 Lander E S 的方法^[9], 依据本植物材料的特点略有修改。

1.2.2 RAPD 扩增 RAPD 扩增在 T3 Thermocycler 扩增仪上进行, 反应总体积为 20 μ L: 5 ng 左右模板 DNA, 2 μ L 10 mmol/L RAPD 引物, 2 μ L 10 \times RAPD buffer (100 mmol/L Tris-HCl pH 9.0, 500 mmol/L KCl, 20 mmol/L $MgCl_2$ 1% Triton X-100 原液), 1 μ L 2.5 mmol/L dNTPs, 0.5 μ L 3 u/ μ L Taq 酶, (中科院遗传所产品), 12.5 μ L ddH₂O, 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5

min, 然后进入循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 37 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 40 个循环, 最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后检测分析。

试验所用的 RAPD 扩增引物根据美国 Operon 公司公布的序列, 由上海生工公司合成。

1.2.3 基因池的构建及引物的筛选 F_3 分离群体根据有无突变特征分为两组—野生型群体和突变型群体, 在两个群体分别随机选取 5 株个体, 等量混合, 形成野生型混合基因池和突变型混合基因池 (简称为野生池和突变池)。由于两亲本间的遗传背景差距比较大, 故用两个亲本和两个群体池一起对 500 个 RAPD 随机引物进行初筛, 并独立重复 6 次, 筛选出有稳定差异的引物, 然后用作图群体对有差异的引物进行复筛, 并独立重复 6 次, 获得 RAPD 标记。

1.2.4 连锁分析 RAPD 扩增产物经电泳检测后, 进行数据收集, 采用 MAPMAKER 3.0 软件进行连锁分析, 并根据 Koshi 函数, 将重组率转换成图距单位 (centi Morgan cM)^[9]。

1.2.5 RAPD 产物的克隆、测序及序列同源性分析

RAPD 反应产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上用 1 \times TAE 电泳缓冲液电泳分离, 片段回收用 DNA 快速纯化/回收试剂盒。回收的 RAPD 产物用 pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) 试剂盒连接, 电击转化到感受态细胞 (电击仪为 Bio-Rad 公司的 E. coli Pulser), 涂于含 IPTG, X-Gal 和氨苄青霉素 (60 mg/mL) 的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取单个白色菌落, LB 中摇动培养后用碱法抽提质粒 DNA, 酶切检测插入片段, 送博亚公司 (上海) 测序。在 NCBI 中输入克隆片段序列, 对 GenBank 进行同源序列搜索, 运用 LaserGene-DNAstar 软件对克隆片段进行同源比较分析。

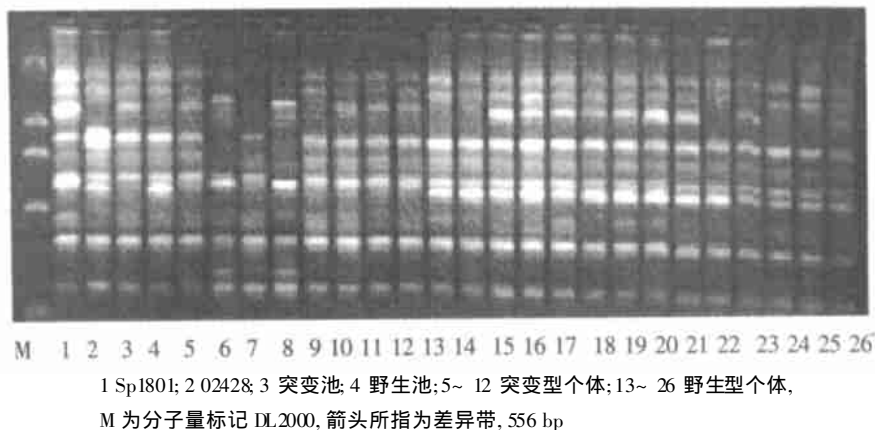
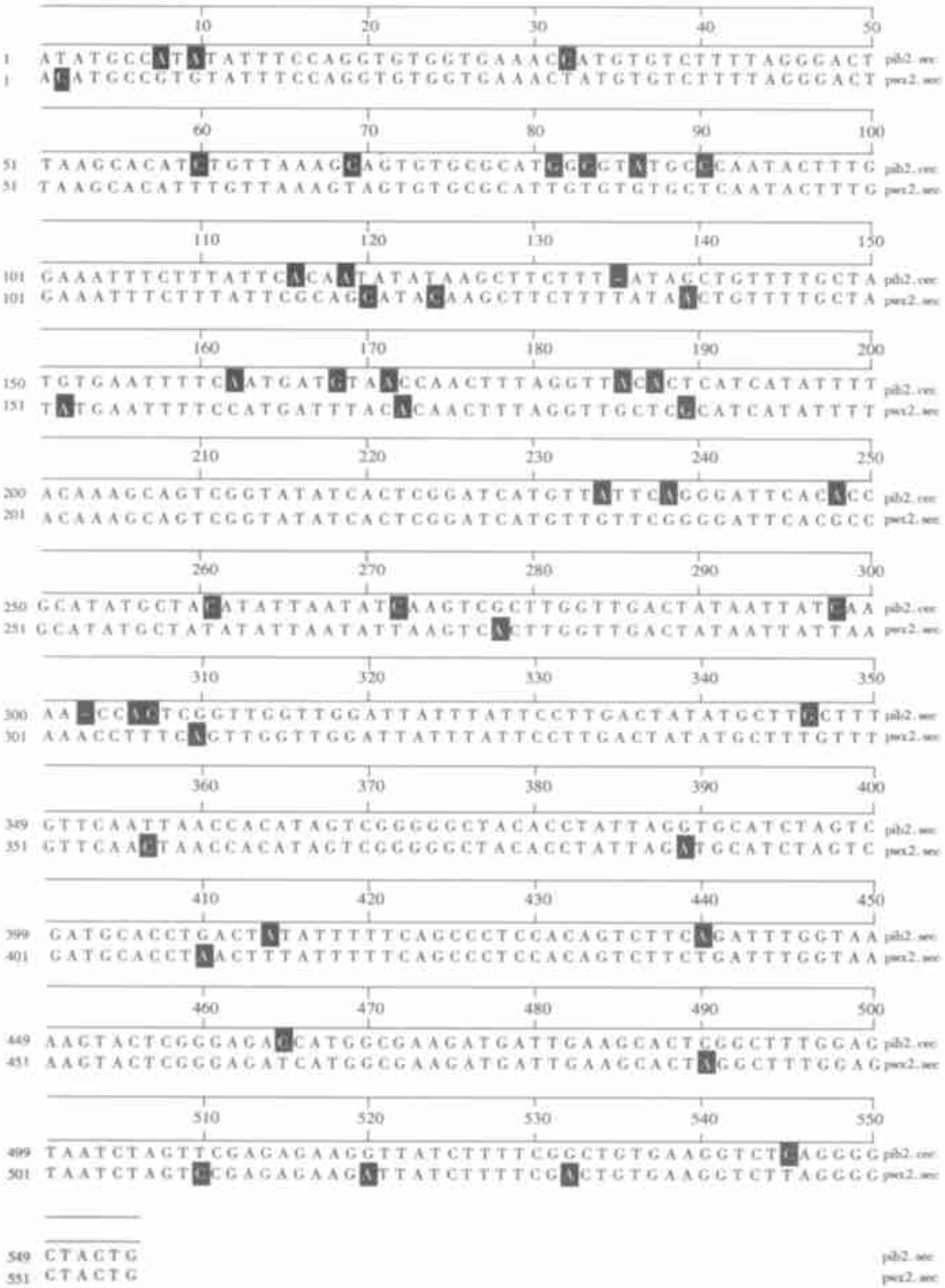
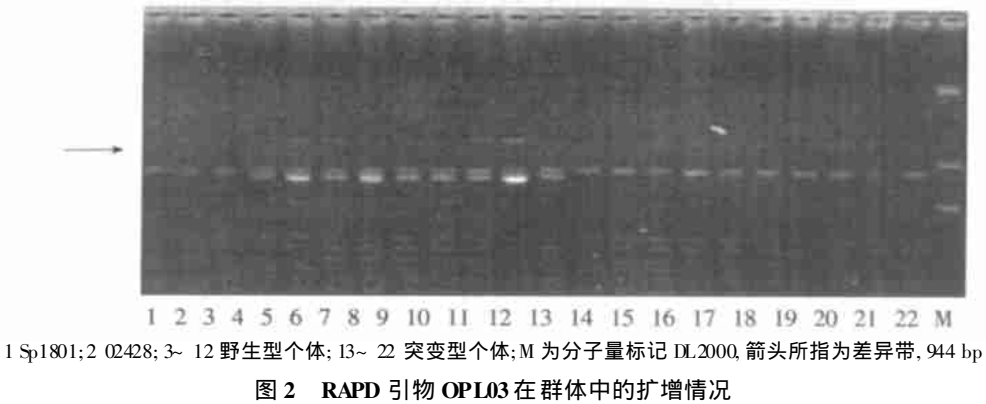


图 1 RAPD 引物 OPI11 在群体中的扩增情况



2 结果与分析

2.1 亲本及池间多态性的检测结果与分析

本研究所用的引物在两亲本间有多态性,表明两亲本的遗传背景差距较大,在所用的 500 个 RAPD 随机引物中,有 33 个引物未扩增出任何产物(约占总数的 6.6%),其余 464 个引物均扩增出产物。从电泳结果看,扩增产物最少的仅为 1 个片段,多的可达到 12~14 个片段,多数为 7~10 个片段,片段大小在 0.1~2.5 Kb 之间,大小片段分布均匀。

2.2 RAPD 标记及其遗传距离

虽然大多数引物均可产生扩增物,但在初筛过程中只有 88 个引物(约占总数的 17.6%)的扩增产物在亲本及池间表现出多态性,对这 88 个引物做 6 次重复扩增试验,有 30 个引物可以重复。再用分离群体复筛这 30 个引物,发现只有 OPI 11(序列: 5' A-CATGCCGIG3') 和 OPL 03(序列: 5' CCAGCAGCTT3') 能在群体间扩增出稳定的差异片段, OPI 11 和 OPL 03 在 02428 和野生型群体上比在 Sp1801 和突变体群体上多扩增 1 个大小分别为 556 bp 和 944 bp 的片段(图 1, 2),这两个特异片段与突变性状紧密连锁。

经过 MAPMAKER3.0 软件的连锁分析, OPI 11 和 OPL 03 与目的基因遗传距离为 0.6 cM 和 5.6 cM, 因此, OPI₁₁₋₅₅₆ 和 OPL₀₃₋₉₄₄ 可以作为此类病变坏死突变基因的 RAPD 标记。虽然这两个引物在群体上扩增的带型非常相似,但测序结果表明,这两个是两个引物在不同基因位点的扩增。

2.3 序列同源性比较

Blast 比较结果表明, OPI₁₁₋₅₅₆ 的序列与抗稻瘟病基因 *pib* 的序列有高达 92% 的同源性(图 3)。我们做过的在突变体上接种稻瘟病菌试验结果表明,此突变体增强了水稻稻瘟病抗性。从这两个结果来看,此突变基因可能与水稻的抗稻瘟病性有关。

3 讨论

本研究构建的 F₂ 与部分 F₃ 分离群体, 突变性状的分离既不符合单基因分离比例的 3:1, 也不符合两对基因控制的 15:1。造成这种现象的原因可能是: ①突变基因与致死基因紧密连锁, 该基因在纯

合条件下, 可导致植株死亡, 使 F₂ 与部分 F₃ 分离群体中突变型个体出现的几率偏低, 而在其他接近正常分离的 F₃ 群体中, 由于突变基因在 F₂ 中与致死基因之间发生了交换, 分离比例接近正常, 表现为突变基因受隐性单基因控制。②本实验室把此突变基因定位于第 8 染色体短臂近着丝点区域, 而该区域的染色体交换通常是受抑制的, 这可能是造成分离群体不正常的原因之一。③杂交组合中的野生型亲本 02428 是一个梗稻品种, 而突变体为籼稻, 这种亚种间的远缘杂交容易出现后代的分离不正常。

植物基因的遗传定位常用的作图群体有 F₂ 群体、BC₁ 群体、DH 群体和近等基因系群体, 而本研究所用分离群体为 F₂ 家系群体, 这两个家系 F₂ 表现为野生型, 经 F₂ 自交一代, 后代野生型与突变体的分离比例接近 3:1, 在作图群体不易建起来时, 用这种 F₂ 家系群体进行基因定位也是一种行之有效的方法。

参考文献:

- [1] Dietrich R A. Arabidopsis mutants simulating disease resistance response [J]. Cell, 1994, 77: 565-577.
- [2] Johal G S. Disease lesion mimic mutations of maize: A model for cell death in plants [J]. BioEssays, 1995, 17: 685-692.
- [3] Buschyes R. The barley Mlo gene: A novel control element of plant pathogen resistance [J]. Cell, 1997, 88: 695-705.
- [4] Gray J. A novel suppressor of cell death in plants encoded by the Lis1 gene of maize [J]. Cell, 1997, 89: 25-31.
- [5] Kosslak R M. Partial resistance to root borne infection by phytophthora sojae in three allelic necrotic root mutants in soybean [J]. J Hered, 1996, 87: 415-422.
- [6] Yin Z. Characterizing rice lesion mimic and identifying a mutant with broad-spectrum resistance to rice blast and bacterial blight [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2000, 13: 869-876.
- [7] Singh K. A new spotted leaf mutant in rice [J]. Rice Genetics Newsletter, 1995, 12: 192-193.
- [8] Cheng Z K. Morphology and inheritance of a new rice leaf death mutant [J]. Chinese Rice Research Newsletter, 1998, 6 (3): 2.
- [9] Lander E S. MAPMAKER: an interactive computer for construction primary genetics linkage maps of experimental and natural population. Genetics, 1987, 1: 174-182.