

一个类病变水稻的遗传分析及基因定位

肖武名,吴亚辉,王 慧,郭 涛,刘永柱,张建国,陈志强

(国家植物航天育种工程技术研究中心,华南农业大学,广东 广州 510642)

摘要:为了弄清一个水稻种质类病变性状的发生特点并探明其类病变的遗传特征,以一个籼型地方水稻品种抗白油占为研究对象,采取症状观察、遗传分析及基因定位等方法,结果发现:其于孕穗期开始在植株中部叶片上出现褐色斑点,早晚季种植均出现;遗传分析表明,其类病变由隐性单基因控制,暂命名为 $lm-(t)$,并通过 SSR 和 InDel 标记将该基因定位于水稻 11 号染色体长臂。目前,11 号染色体上尚未见相关基因的报道,该基因可能是一个新的类病变基因。

关键词:水稻;类病变;遗传分析;基因定位

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)04-0008-05

doi:10.7668/hbxb.2015.04.002

The Inheritance of a Lesion Mimic Rice Line and Mapping of Its Lesion Mimic Gene

XIAO Wu-ming, WU Ya-hui, WANG Hui, GUO Tao, LIU Yong-zhu, ZHANG Jian-guo, CHEN Zhi-qiang

(National Engineering Research Center of Plant Space Mutation Breeding,

South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: To know the appearance of lesion mimic in a rice accession and understand the inheritance of its lesion mimic, Kangbaiyouzhan (Kbyz), an *indica* rice landrace, was researched in this study. Lesion observation, genetic analysis and gene mapping were applied in this study. It was found that Kbyz showed brown lesions firstly on middle leaves of the plants from booting stage, no matter it was planted at early season or late season. By genetic analysis, its lesion phenotype was found to be controlled by a single recessive gene, named $lm-(t)$ tentatively, which was further mapped on the long arm of chromosome 11 using SSR and InDel markers. No genes response for rice lesion mimic are reported from chromosome 11 thus far, the gene in this study may be a novel lesion mimic gene.

Key words: Rice; Lesion mimic; Genetic analysis; Gene mapping

植物类病变 (Lesion mimic, LM) 是指植物在没有明显损伤、逆境胁迫或者外界病原物侵染的条件下,能够在叶片、叶鞘或者整株上自发形成坏死斑的一种现象。根据类病变的表型可将其分为起始型和扩散型两类。前者指植物在未受到病原物侵染时,细胞坏死就能自发和随机在叶片或植株多个部位独立形成特定大小的坏死斑,斑点具有相对稳定的分布位置和大小,如 *blm* 等;后者指斑点在形成以后会很快扩散到叶片的其他部位,甚至包括叶鞘和茎秆,因此,被称为扩散型或反馈型斑点,如 *spl1* 和

lmm1^[1-3]。引起类病变突变的原因比较复杂,既有植物内部基因的作用,也受光照、温度、湿度和养分等环境因素的影响^[4]。

自 20 世纪 70 年代在水稻中首次报道类病变突变体 (Sekiguchi lesion, *sl*), 已经相继发现了近百种类似的突变体^[5]。目前,水稻类病变突变体有很多命名方法,如根据叶片出现的点状斑 (Spotted leaf) 命名,称为 *spl* 突变体,目前已有数十个 *spl* 突变体;在国际谷类作物基因研究网站 (www.gramene.org) 上注册的 32 个水稻类病变突变体,统

收稿日期:2015-04-10

基金项目:国家“863 计划”项目 (2012AA101201);超级稻新品种选育与示范推广项目 (112003);广东省科技计划项目 (2011A020102004)

作者简介:肖武名 (1982-),男,湖南祁东人,助理研究员,博士,主要从事水稻遗传育种研究。

通讯作者:陈志强 (1956-),男,广东揭阳人,教授,硕士,主要从事水稻遗传育种相关研究。

—以 *lrd* (Lesion resembling disease) 命名, 分别为 *lrd1* ~ *lrd32*。此外, 许多早期的突变体与基因的名称仍被保留使用, 如 *bl* (Brown leaf spot)、*blm* (Blast lesion mimic)、*lmi* (Lesion mimic initiation)、*spl* (Spotted leaf) 等, 其中以 *spl* 命名的最多^[6-8]。绝大多数的水稻类病变突变体受隐性单基因控制, 也有部分受显性单基因控制, 个别由隐性双基因控制, 有的受母体遗传。其中受显性单基因控制的类病变突变体有: *Cdr3*、*OsNPR1*、*spl12*、*spl13*、*spl15*、*spl18*、*spl24*、*spl26* 和 *Spl27* 等^[5,9-12]。目前, 已报道的斑点叶基因有 50 多个, 第 9, 11 染色体未发现相关基因, 其他染色体上均有发现的报道。迄今为止, *SPL5*、*SPL7*、*SPL11*、*SPL18*、*SPL28* 等类病变基因已被克隆, 它们分别编码不同的蛋白, 包括热剪接因子 3b 亚基、热激蛋白转录因子、E3 泛素连接酶、酰基转移酶、网格蛋白的受体复合体等^[10-11,13-15]。

植物的类病变与植物的抗病防御、细胞发育和凋亡有关。研究植物类病变材料坏死斑的形成机制, 对了解植物细胞程序性死亡的信号传导途径和抗病机理及栽培品种的遗传改良具有重要意义, 是目前植物生理学、分子生物学和分子遗传学的研究热点。国家植物航天育种工程技术研究中心收集了一份地方粳型水稻种质—抗白油占, 前期研究发现其成株期高抗白叶枯病, 可作抗源加以利用, 但其在生育中后期叶片上出现褐色坏死斑, 对其应用带来不利影响。为了弄清其类病变的形成状况及遗传基础, 本研究系统观察了该材料的坏死斑出现情况, 通过构建群体对其斑点开展遗传分析, 并应用 SSR (Simple sequence repeats) 和 InDel (Insertion/Deletion polymorphism) 标记对其类病变基因进行了定位。

1 材料和方法

1.1 试验材料及生长条件

本研究的类病变材料为本研究中心收集的一份粳型水稻种质—抗白油占。2012 年早晚两季均将其种植于华南农业大学校内教学与科研试验基地, 早季 3 月 5 日播种、4 月 6 日移栽, 晚季 7 月 25 日播种、8 月 7 日移栽, 种植规格为 6 行 × 6 株的小区, 单株植、株行距 20 × 20 cm, 常规栽培管理, 生育期内每 5 d 观察一次坏死斑点的形成情况。孕穗初期将顶部新叶 (倒 3 叶或倒 4 叶) 的中部和尖部用锡纸遮光, 当该叶片无锡纸处出现坏死斑点后, 观察遮光处及未遮光处坏死斑点的形成情况。为了观察抗白油占在室内条件下的类病变表型, 将其种子消毒后种于灭菌的桶装营养土中, 在 28 ℃、14 h 光照/10 h

黑暗的培养箱中生长, 生育期内观察坏死斑的形成情况。

1.2 类病变的遗传分析

以抗白油占作父本、日本晴作母本杂交, F_1 及 F_2 分别于 2012 年晚季和 2013 年早季植株于华南农业大学校内教学与科研试验基地。统计 F_1 及 F_2 中显斑及无斑的植株数, 计算 F_2 有斑与无斑植株的分离比, 卡方测验遗传比例, 分析类病变的遗传基础。

1.3 类病变基因的定位

首先, 从日本晴/抗白油占的 F_2 群体中随机选取正常植株和类病变植株各 10 株, 每个单株取等量叶片, 将正常植株和类病变植株的叶片分别混合, 提取总 DNA 作为正常池和类病变基因池。其次, 采用均匀分布于全基因组的 240 对 SSR 标记分析双亲, 有多态的标记进一步分析正常池和类病变池以确定连锁的 SSR 标记; 将连锁的 SSR 标记分析 F_2 群体中的全部类病变植株, 初步定位目的基因。再次, 在初步定位区域内搜索新的 SSR 标记, 并根据日本晴和 93-11 的序列差异开发新的 InDel 标记, 有多态的新标记分析重组个体以缩小定位区间。计算重组率, 采用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传距离 (Centimorgan, cM)。DNA 提取、PCR 反应、电泳及检测参照 Xiao 等^[16]及马健阳等^[17]的方法。

2 结果与分析

2.1 抗白油占的类病变表型

观察发现, 2012 年早季种植于大田的抗白油占在幼苗期及分蘖期整个植株均无坏死斑出现, 直至孕穗期才在植株的中部叶片 (倒 5 叶或倒 6 叶) 上开始出现褐色斑点, 斑点最先见于这些叶片的尖端及离尖端不远处的叶缘部位, 随后向叶片中间和基部扩展 (图 1)。到成熟期, 植株中部叶片 (倒 4 叶 ~ 倒 6 叶) 上的叶斑数目增多并扩展至整个叶片, 倒 7 叶及下部叶片由于老化变黄或枯死, 鲜见斑点出现; 倒 2 叶和倒 3 叶只在尖端及叶缘出现部分斑点, 有的斑点连成片; 剑叶几乎不见斑点。相应叶片的背面也出现斑点, 且斑点发生情况与表面的基本一致, 但是斑点数目及扩散范围明显少于表面。进一步的调查发现, 当年晚季种植于大田的该材料也在孕穗期从植株中部叶片的尖端和叶缘开始出现斑点, 其斑点发生情况与早季种植时的发生情况基本一致, 说明其斑点的发生与季别无关。可见, 抗白油占的类病变属于生殖生长阶段起始型。

调查发现, 种植于培养箱内的抗白油占也在孕穗期开始出现褐色斑点, 其斑点的出现时间和发生

情况与大田种植时无明显差异。对尚未出现褐色斑的倒3叶或倒4叶用锡纸遮光处理,待叶片其他部位出现明显的坏死斑点后,揭开锡纸发现遮光处的叶片部位无坏死斑的形成(结果未显示)。试验结果表明,抗白油占的细胞坏死是一类受光照影响的细胞坏死。

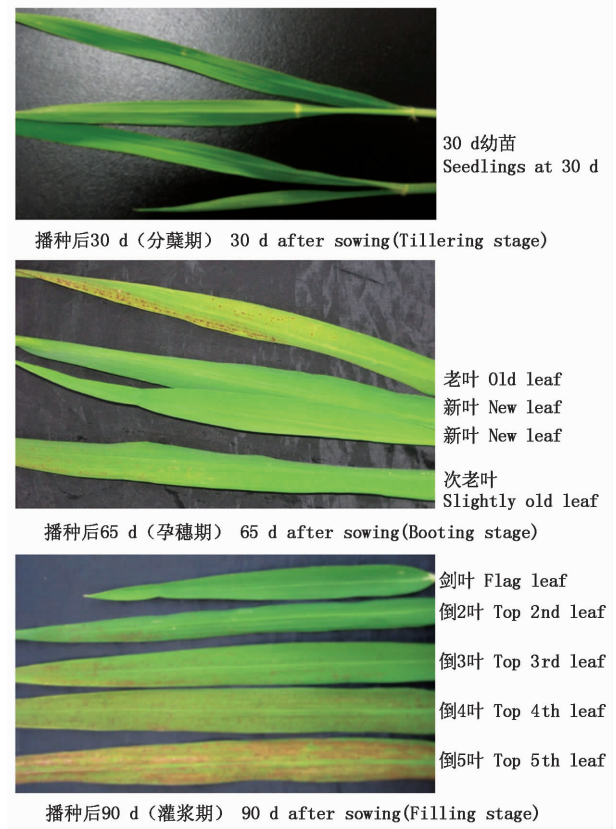


图1 抗白油占在不同生育期的类病变出现情况

Fig.1 Lesion mimic appearing in Kangbaiyouzhan at different growth stages

2.2 抗白油占类病变的遗传分析

调查结果表明,抗白油占与日本晴的F₁植株全生育期内均无类病变出现,F₂群体中237个植株出现与亲本抗白油占一样的类病变、742株无斑出现,无斑植株与有斑植株的分离比符合3:1的理论比值(表1)。研究结果表明,抗白油占之类病变症状由隐性主效单基因控制,并将该基因命名为 $lm-(t)$ 。

表1 抗白油占、日本晴及其F₁、F₂群体类病变的出现情况

Tab.1 Lesion mimic in Kangbaiyouzhan, Nipponbare and its F ₁ and F ₂				
材料 Materials	无斑个体 No. of individuals without lesion mimic	有斑个体 No. of individuals with lesion mimic	分离比 Segregation ratio	χ^2
抗白油占 Kangbaiyouzhan	0	36	—	—
日本晴 Nipponbare	36	0	—	—
F ₁	13	0	—	—
F ₂	742	237	3:1	0.29

2.3 类病变基因的定位

本研究采用分离群体分析法和隐性群体分析法对类病变基因 $lm-(t)$ 进行连锁分析和定位,采取先确定与目标性状连锁的分子标记、再用连锁标记检测所有隐性(有斑)个体,统计重组体并计算遗传距离的策略。经初步分析发现,11号染色体长臂上的一个SSR标记RM144与该基因连锁,该标记在237个有斑个体中共检测出23个重组体。接下来在该标记两侧寻找能显示双亲差异的SSR标记,结果发现,靠着丝粒一端的SSR标记RM27334在双亲间存在多态,且在隐性群体中检测出14个重组体,这14个重组体均包含在RM144检测出的23个重组体里面,重组体的减少说明基因 $lm-(t)$ 位于RM144的另一侧。随后,在标记RM27334往着丝粒一侧寻找在双亲间有多态的SSR标记,共搜索11个SSR标记,结果发现4个标记(RM27051、RM27115、RM27186及RM27299)在双亲间存在多态。进一步分析发现,标记RM27299检测出7个重组体、且均来自RM144和RM27334的重组体,说明标记RM144、RM27334和RM27299均位于基因 $lm-(t)$ 的同一侧,其与该基因的遗传距离分别是4.9,2.9,1.5 cM。此外,标记RM27051、RM27115及RM27186分别检测出另外的35,28,13个重组体,说明这些标记位于该基因的另一侧,其与该基因的遗传距离分别是7.4,5.3,2.7 cM。可见,类病变基因 $lm-(t)$ 位于标记RM27299及RM27186之间。为了进一步缩小该基因的区间,根据参考品种日本晴(<http://www.rgp.dna.affrc.go.jp>)和93-11(<http://www.genomics.org.cn>)的序列在RM27299~RM27186开发了7个InDel标记,结果只有2个标记(Ind303和Ind306)在双亲间存在多态,其中Ind303检测出4个重组体且均包含在RM27186对应的重组体中,Ind306无重组体被检测出来,说明Ind303与该基因的遗传距离为0.8 cM、Ind306与该基因共连锁。上述结果表明,基因 $lm-(t)$ 位于标记Ind303和RM27299之间,与它们的遗传距离分别是0.8,1.5 cM。经比对分析,标记Ind303和RM27299之间的物理距离约641.5 kb。表2列出了该基因的连锁标记,图2为该基因的遗传作图结果。

3 讨论

本研究的抗白油占是一个具有较好白叶枯病抗性的地方种质,由于其在孕穗后出现褐色斑点,影响叶片的光合作用,此不利性状妨碍其白叶枯病抗性的利用。为了弄清其类病变性状的发生情况及遗传

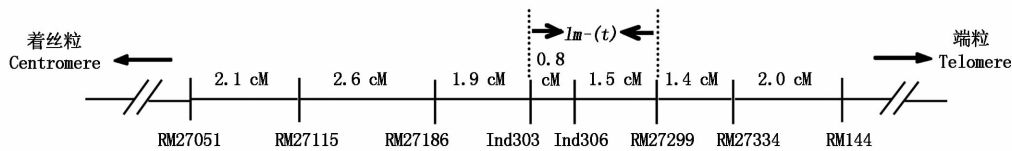


图 2 类病变基因 $lm-(t)$ 的遗传连锁图

Fig.2 The genetic map of lesion mimic gene $lm-(t)$

表 2 定位类病变基因 $lm-(t)$ 的分子标记

Tab.2 Molecular markers used to map $lm-(t)$ in this research

引物名称 Markers	引物序列 Primer sequences	退火温度/℃ Annealing temperature	扩增片段大小/bp Product size
RM27051	F:ACCTGGCTACCATCCAAACAGG R:GCTTTAGGGAGTTCTCTGATGTGC	57	281
RM27115	F:CTCCCTCCACCGGCTTCTTAGC R:GGTAGTTGGACGGCAGGGATGG	57	255
RM27186	F:GGTTCGGACCTCCGAACACAGC R:CTCCCAACCTTCTCCTCCTTCC	57	328
Ind303	F:ATGTCTCGTGGACTAGATG R:AACTCCTCATGCACAGTG	56	104/121
Ind306	F:TGATGGACTAGAACATGGC R:GGTATTCTGGCTAGCTCTAC	56	113/118
RM27299	F:CAACCGAGAGGGTGAAGGAAGC R:CGATTCCACAGCTGCCAACG	57	179
RM27334	F:CAACCTCCTATTTCATTTAGCC R:TATCCTTATCTATCCCGTCTCTCC	56	256
RM144	F:CATGTTGTGCTTGTCTACTGC R:AGCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGC	58	245

特性,笔者对此进行了系统的调查,研究表明,抗白油占的类病变由隐性主效单基因控制。此外,笔者还对 F₂ 群体开展了白叶枯病抗性调查,发现无斑和有斑的群体中均出现抗感白叶枯病的植株,且抗感植株比在 2 个群体均接近 3∶1 的理论比值(结果未显示),说明其白叶枯病抗性和类病变性状在 F₂ 可以被分离开来。因此,抗白油占的白叶枯病抗性可以被有效利用,其叶片出现类病变的不利性状并不一定带来连锁累赘。已报道的水稻类病变材料中,大多数对白叶枯病或稻瘟病的抗性有所提高,表明类病变基因激活了植株的防御系统,并且不同的类病变基因可能参与了不同的抗病信号传导途径^[18]。本研究中的类病变基因对其白叶枯病和稻瘟病抗性是否存在影响尚未清楚,下一步研究将构建 $lm-(t)$ 的近等基因系研究其对白叶枯病和稻瘟病的抗性影响。

植物类病变出现的时间不一且形状各异,有的在幼苗期出现、有的在中后期出现,圆形、椭圆形、线状和杆状的均有报道,还有的以融合斑的形式存在^[19]。类病变突变体在产生斑点的同时往往伴随其他农艺性状的改变,如株高、穗长、育性、分蘖力等性状的变化。目前,植物类病变突变体在遗传育种

上的应用尚少见,主要是因为类病变突变体对作物的农艺性状有较大的负面影响^[20]。本研究的类病变材料抗白油占的褐色斑点在孕穗期才开始出现,而且不受环境条件的影响,其特色之处在于其斑点集中出现在植株的中部叶片,基部老叶和剑叶上却难以见到斑点。这说明其斑点的起始和形成需要一定的过程,基部老叶由于出现较早,在出现斑点之前已经枯黄老化,剑叶由于出现较晚,在生育期内来不及形成斑点。由于此特性,抗白油占的叶片仍保持了较好的光合作用,其株高、分蘖力、结实率、籽粒充实度等均表现正常(结果未显示)。因此,本研究的类病变现象可以作为形态标记加以利用。

近年来,国内外对水稻的类病变研究较多,大多数研究以突变体为主,积累了许多重要的研究成果。迄今被报道的类病变基因达数十个,但是在 11 号染色体上鲜见相关基因的报道。本研究的抗白油占为一份籼型水稻种质,而非突变体,其类病变现象是如何产生的已无从探究。本研究将其类病变基因定位于 11 号染色体长臂,目前该区域尚未见相关基因的报道,该基因可能是一个新的水稻类病变基因,其定位结果为其克隆和功能分析奠定了前期基础。

参考文献:

- [1] Johal G S, Hulbert S H, Briggs S P. Disease lesion mimic mutation of maize: A model for death in plants[J]. *BioEssays*, 1995, 17(8): 685 – 692.
- [2] 黄奇娜, 杨 杨, 施勇烽, 等. 水稻斑点叶变异研究进展[J]. *中国水稻科学*, 2010, 24(2): 108 – 115.
- [3] 奉保华, 杨 杨, 施勇烽, 等. 水稻淡褐斑叶突变体 *lb-s1* 的遗传分析与基因定位[J]. *中国水稻科学*, 2012, 26(3): 297 – 301.
- [4] 陈红霖, 向阳海, 赵纪莹, 等. 水稻类病变突变体 *c5* 的遗传分析与目标基因的精细定位[J]. *作物学报*, 2013, 39(7): 1148 – 1154.
- [5] Takahashi A, Kawasaki T, Henmi K, *et al.* Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 1999, 17(5): 535 – 545.
- [6] 陈析丰, 金 杨, 马伯军. 水稻类病变突变体及抗病性的研究进展[J]. *植物病理学报*, 2011, 41(1): 1 – 9.
- [7] 刘道峰, 程祝宽, 刘国庆, 等. 水稻类病变突变体 *lmi* 的鉴定及其基因定位[J]. *科学通报*, 2003, 48(8): 831 – 835.
- [8] Jung Y H, Lee J H, Agrawal G K, *et al.* The rice (*Oryza sativa* L.) blast lesion mimic mutant, *blm*, May confer resistance to blast pathogens by triggering multiple defense-associated signaling pathways[J]. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB/Societe Francaise de Physiologie Vegetale*, 2005, 43(4): 397 – 406.
- [9] Zeng Y X, Ma L Y, Ji Z J, *et al.* Fine mapping and candidate gene analysis of *LM3*, a novel lesion mimic gene in rice[J]. *Biologia*, 2013, 68(1): 82 – 90.
- [10] Yamanouchi U, Yano M, Lin H X, *et al.* A rice spotted leaf gene, *spl7*, encodes a heat shock transcription factor protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(11): 7531 – 7535.
- [11] Zeng L R, Qu S H, Bordeos A, *et al.* Spotted leaf 11, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(10): 2795 – 2808.
- [12] Wang L J, Pei Z Y, Tian Y C, *et al.* OsLSD1, a rice Zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(5): 375 – 384.
- [13] Chen X F, Hao L, Pan J W, *et al.* *SPL5*, a cell death and defense-related gene, encodes a putative splicing factor 3b subunit 3 (SF3b3) in rice[J]. *Molecular Breeding*, 2012, 30(2): 939 – 949.
- [14] Mori M, Tomita C, Sugimoto K, *et al.* Isolation and molecular characterization of a spotted leaf 18 mutant by modified activation-tagging in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63(6): 847 – 860.
- [15] Qiao Y L, Jiang W Z, Lee J H, *et al.* SPL28 encodes a clathrin-associated adaptor protein complex 1, medium subunit $\mu 1$ (AP1M1) and is responsible for spotted leaf and early senescence in rice (*Oryza sativa*) [J]. *New Phytol*, 2010, 185(1): 258 – 274.
- [16] Xiao W M, Yang Q Y, Wang H, *et al.* Identification and fine mapping of a resistance gene to *Maganaporthe oryzae* in a space-induced rice mutant[J]. *Molecular Breeding*, 2011, 28(3): 303 – 312.
- [17] 马健阳, 陈孙禄, 张建辉, 等. 一个水稻类病条纹斑突变体的鉴定和遗传定位[J]. *中国水稻科学*, 2011, 25(2): 150 – 156.
- [18] 王建军, 朱旭东, 王林友, 等. 水稻类病变突变体 *lrd40* 的抗病性与细胞学分析[J]. *中国水稻科学*, 2005, 19(2): 111 – 116.
- [19] Wu C J, Bordeos A, Madamba M, *et al.* Rice lesion mimic mutants with enhanced resistance to diseases[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2008, 279(6): 605 – 619.
- [20] 陈萍萍, 叶胜海, 赵宁春, 等. 浙粳 22 类病斑突变体 *spl(t)* 特征及其基因定位[J]. *核农学报*, 2010, 24(1): 1 – 6.