

水稻 PCD 相关基因的定位研究

李喜焕¹ 刘国振¹ 刘国庆^{1,2} 朱立煌² 马峙英¹

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

摘要 植物中的细胞程序化死亡(PCD)在植物的发育、抗病及植物与环境互作等过程中发挥着极其重要的作用。本研究以我国学者发现的特殊的水稻细胞死亡控制突变体 3037(M)为材料,采用微卫星 DNA 标记(共计 159 个微卫星引物)技术对突变体性状进行基因定位研究。结果表明,该突变体 PCD 基因位于水稻的第 8 染色体和第 12 染色体,为进一步精细定位突变体基因及基因克隆奠定了基础。*

关键词 水稻;细胞程序化死亡(PCD)突变体;SSR

中图分类号: S511.032 文献标识码: A

The Tag Analysis of Rice PCD-related Gene

LI Xi-Huan¹ LIU Guo-Zhen¹ LIU Guo-Qing^{1,2} ZHU Li-Huang² MA Zhi-Ying¹

(¹ Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001; ² Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Programmed cell death (PCD) is important for plant growth, disease resistance and its interactions with environment. A special rice cell death mutant 3037(M) was analyzed using SSR technology to tag the mutant gene. The results indicated that the mutant gene was located on rice chromosomes 8 and 12. So they could be the reference to tag, clone the mutant gene.

Key words Rice; Programmed cell death (PCD) mutant; SSR

PCD (Programmed Cell Death), 是指由细胞内死亡程序所控制的细胞死亡。生物在生长发育及形态建成过程中,利用 PCD 来控制细胞数目,或作为一种防御机制清除被感染、被诱变或被损伤的细胞^[1]。因此 PCD 是生命活动不可缺少的组成部分。在植物的生长发育过程中,自始至终都存在着细胞死亡,如根系生长发育中表皮细胞的死亡、维管束分化过程中导管细胞的死亡、花粉发育中绒毡层细胞的死亡、植物叶片的衰老与死亡等^[2~4]。

植物中已报道了一些细胞死亡控制突变体。到目前为止,玉米有 40 多种类似的突变体^[5~7],拟南芥中报道了 8 个类似突变体^[8,9],Hu 等^[10]报道的大麦中的 4 个突变体,被定位在同一基因簇位点上,其中 3 个突变体表现共显性,1 个表现隐性。在水稻中,Singh^[11]共报道了 12 个类似的突变体,这些突变性状大多数被定位于水稻的传统遗传连锁图上,并

作为标志基因广泛应用。最近,我国的程祝宽等在籼稻中发现了一种突变体,根据坏死斑的发生特征初步判断,它可能是一个新的水稻细胞程序化死亡突变体^[12]。本文研究的目的在于对该突变体基因进行初步定位研究。

1 材料与方法

1.1 材料

3037(突变体),简称 3037(M),籼稻,亲本之一,由扬州大学农学院提供。

02428,粳稻,亲本之二,由中国科学院遗传研究所提供。

3037(野生型),简称 3037(W),籼稻,由扬州大学农学院提供。

F₂ 群体,3037(M)与 02428 杂交后的 F₁ 自交产生的后代群体。

*基金项目:国家自然科学基金资助课题(39880020)。

作者简介:李喜焕(1974-),女,河北保定人,助教,硕士学位,细胞、分子遗传及育种应用。

Received(投稿日期):2002-03-22, Accepted(接受日期):2002-07-28.

1.2 方法

试验采用 159 个水稻 SSR 引物,每个引物由一对 20 核苷酸左右特异序列组成。25 μ L 的反应体系中,模板 DNA 30 ng, 0.6 μ mol/L SSR 引物, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 U *Taq* 酶。SSR 扩增程序:94 5 min;94 1 min,58 1 min,72 1 min 30 s,35 个循环;72 10 min。

2 结果与分析

2.1 杂交亲本(3037(M)与02428)间 SSR 引物筛选结果

试验采用水稻遗传连锁图上的 159 个 SSR 引物,分别扩增 2 个杂交亲本 [3037(M)与 02428] 的 DNA 样品。结果表明,在 2 个材料间具有明显扩增产物的 SSR 引物有 105 个,其余 54 个引物不能扩增

出产物,表明 SSR 技术揭示不同材料间多态性的可行性。105 个具扩增谱带的 SSR 引物,经独立重复 3 次后,有 62 个引物在两个亲本间具有稳定可靠的多态性谱带,揭示了双亲间 SSR 位点的多态性(图 1)。表 1 列出了在双亲间表现多态性的 62 个 SSR 引物的扩增结果。

表 1 中的 62 个多态性引物,揭示了双亲间的多态性情况,它们在水稻染色体上的分布比较均匀,其中以位于染色体 2 的引物数量最多,达 11 个,而且大部分聚集于染色体长臂上,说明双亲在此处的多态性较高,差异较大;其次,以分布在染色体 1、6、7、9、10、11、12 的引物数量为多(4~7 个),而且分布比较接近;以分布于染色体 3、5、8 引物较少(2~3 个)。这些多态性引物在染色体上的分布情况说明,它们能够作为一套多态性引物材料,用于 3037(M)

表 1 62 个 SSR 多态性引物对杂交亲本 3037(M)、02428 的扩增结果

Table 1 Total and polymorphic SSR primers amplified with DNA of 3037(M) and 02428

序号 Number	引物 Primer	谱带数 Bands number	多态性谱带数 Polymorphic bands number	染色体 Chromosome	序号 Number	引物 Primer	谱带数 Bands number	多态性谱带数 Polymorphic bands number	染色体 Chromosome
1	RM23 ^b	2	2	1	82	RM250	2	2	2
6	RM29	3	2	2	84	RM253	2	2	6
7	RM30	3	2	6	87	RM256	2	2	8
17	RM47	4	1	7	88	RM257	2	2	9
18	RM48	2	1	2	89	RM258	2	2	10
26	RM80	4	2	8	92	RM261	2	2	4
32	RM201	2	2	9	93	RM262	2	2	2
33	RM202	2	2	11	102	OSR2	2	2	1
35	RM204	3	3	6	106	OSR6	2	2	11
36	RM205	2	2	9	107	OSR7	3	1	8
37	RM206	2	2	11	115	OSR15	2	2	4
38	RM207	2	2	2	120	OSR20	2	2	12
39	RM208	2	2	2	126	OSR26	2	2	2
40	RM209	4	2	11	127	OSR27	2	2	1
43	RM212	2	2	1	128	OSR28	2	2	9
44	RM213	2	2	2	129	OSR29	2	2	9
51	RM220	2	2	1	131	OSR31	3	3	3
52	RM221	5	3	2	132	OSR32	2	2	12
53	RM222	2	2	10	133	OSR33	2	2	10
54	RM223	2	2	8	202	RM2	2	2	7
55	RM224	2	2	11	203	RM3	3	2	6
57	RM226	3	3	4	206	RM6	3	3	2
59	RM228	2	2	10	211	RM11	2	2	7
65	RM233B	2	2	5	211'	RM13	2	2	5
66	RM234	2	2	7	212	RM14	4	4	1
67	RM235	2	2	12	213	RM16	2	2	3
72	RM240	2	2	2	217	RM20A	3	3	12
74	RM242	2	2	9	217'	RM20B	2	1	11
78	RM246	2	2	1	218	RM21	2	1	11
79	RM247	2	2	12	223	RM123	2	2	?
80	RM248	2	2	7	228	RM168	2	2	3

注: ? 表示目前尚未定位于染色体的引物。

与 02428 杂交后代分离群体,筛选与突变基因连锁的标记,并将目标基因定位。因此,这些在双亲间具有多态性的引物,为以后基因精细定位打下了良好

的基础。图 2 表示多态性引物在水稻 12 条染色体上的分布情况。

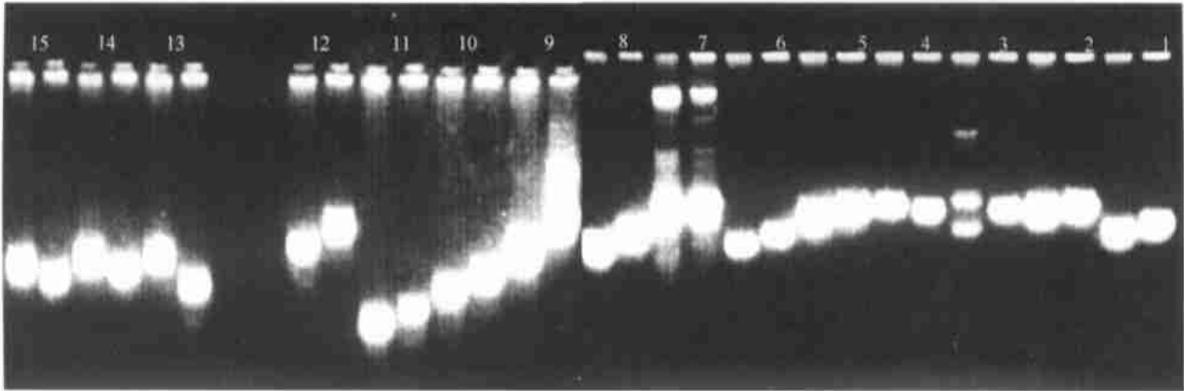


图 1 部分多态性 SSR 引物对 3037(M) 与 02428 的扩增结果

Fig. 1 Results of polymorphic SSR primers amplified with 3037(M) and 02428

1 ~ 15 是部分多态性 SSR 引物,引物序号从右至左分别为 32,33,35,37,39,44,52,55,57,66,67,74,79,82,88。

1—15 are polymorphic SSR primers. The primer number from right to left is 32,33,35,37,39,44,52,55,57,66,67,74,79,82,88.

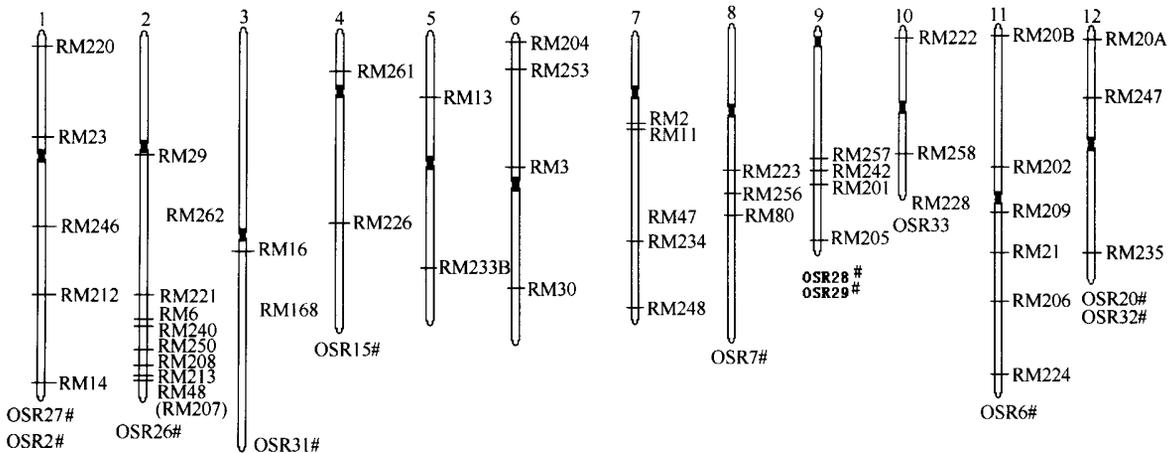


图 2 SSR 多态性引物在水稻染色体上的分布示意图

Fig. 2 Distribution of SSR polymorphic primers on rice chromosomes

注: # 表示 OSR 系列引物,图中只标明 OSR 引物所在染色体,并不表示在染色体上的准确位置。

2.2 突变体与野生型间 SSR 引物筛选结果

突变体与野生型材料之间,除突变性状以外,其余基因基本一致,因此,在突变体与野生型间具有多态性的引物,可能就是与突变基因连锁的标记。对于在突变体与野生型间表现多态性的引物,采用突变体亲本单株 DNA [记作 3037(M1) ~ 3037(M6)], 以及 F₂ [3037(M) × 02428 杂交 F₁ 自交后代] 4 株突变体单株 DNA 分别来检验。结果表明,在 159 个 SSR 引物中,独立重复 3 次后,只有引物 26(RM80)、54(RM223)、87(RM256)、132(OSR32) 表现稳定可靠

的多态性谱带(图 3,图 4,图 5),表明这 4 个 SSR 引物是与突变基因连锁的标记。由于这 4 个多态性引物分别位于水稻染色体 8 和 12,因此,将目标基因定位于水稻第 8 染色体和第 12 染色体。图 6 表示引物 26(RM80)、54(RM223)、87(RM256)、132(OSR32)在水稻染色体上的详细位置。表 2 列出了具有稳定可靠多态性谱带的 SSR 引物扩增情况。其中引物 26(RM80)、54(RM223)、87(RM256)位于染色体 8;引物 132(OSR32)位于染色体 12。

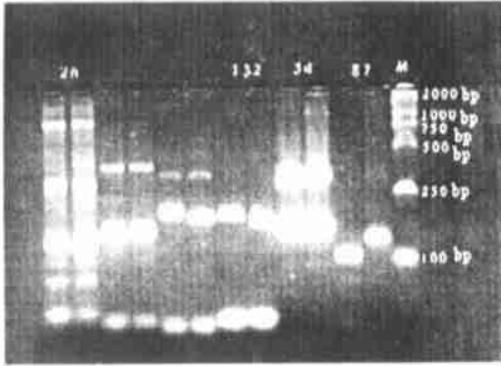


图3 多态性 SSR 引物对 3037 (M) 与 3037 (W) 扩增结果
Fig.3 Results of polymorphic SSR primers amplified with 3037 (M) and 3037 (W)

M 为分子量标记；引物序号从右至左分别为 87 (RM256) , 54 (RM223) , 132 (OSR32) , 26 (RM80) ; [DNA 模板：右 3037 (M) , 左 3037 (W)]。
M is DNA marker ; the primer number from right to left is 87 (RM256) , 54 (RM223) , 132 (OSR32) , 26 (RM80) ; [DNA :right 3037 (M) , left 3037 (W)] .

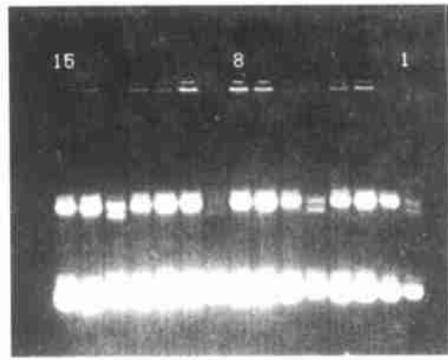


图4 引物 RM223 对 3037 (M) , 3037 (W) , 3037 (M1) ~ 3037 (M6) 亲本单株及 F₂ 突变体单株同时扩增结果

Fig.4 Results of RM223 amplified with 3037 (M) , 3037 (W) , 3037 (M1) ~ 3037 (M6) , F₂ mutant DNA
1、5、9、13 为 3037 (W) ; 2 为 3037 (M) ; 3、4、6、7、8、10 为 3037 (M1) ~ 3037 (M6) ; 11、12、14、15 为 F₂ 突变体。
1、5、9、13:3037 (W) ; 2:3037 (M) ; 3、4、6、7、8、10:3037 (M1) ~ 3037 (M6) ; 11、12、14、15:F₂ mutant DNA.

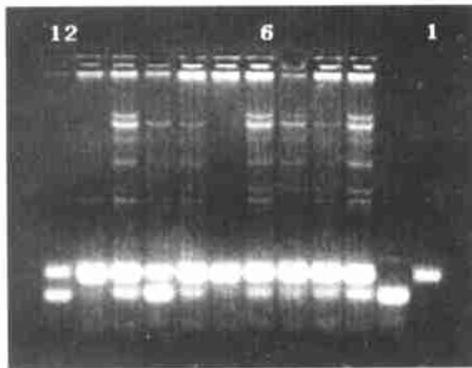


图5 引物 RM256 对 3037 (M) , 3037 (W) , 3037 (M1) ~ 3037 (M6) 亲本单株及 F₂ 突变体单株同时扩增结果

Fig.5 Results of RM256 amplified with 3037 (M) , 3037 (W) , 3037 (M1) ~ 3037 (M6) , F₂ mutant DNA
1 为 3037 (M) ; 2 为 3037 (W) ; 3 ~ 8 为 3037 (M1) ~ 3037 (M6) ; 9 ~ 12 为 F₂ 突变体。
1:3037 (M) ; 2:3037 (W) ; 3 ~ 8:3037 (M1) ~ 3037 (M6) ; 9 ~ 12:F₂ mutant DNA.

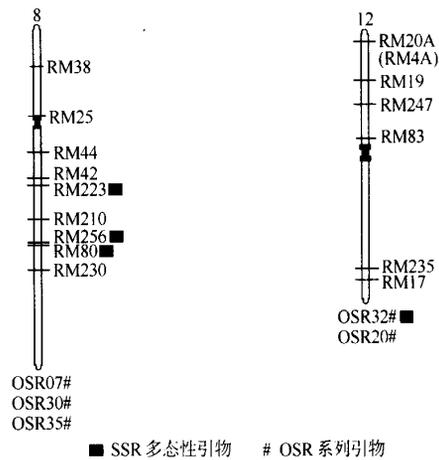


图6 4 个 SSR 多态性引物在水稻染色体上的详细分布图

Fig.6 Distribution of four polymorphic SSR primers on rice chromosomes

表2 4 个多态性 SSR 引物在 3037 (M) 与 3037 (W) 间的扩增结果

Table 2 Total and polymorphic SSR primers amplified with DNA of 3037 (M) and 3037 (W)

序号 Number	引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	SSR 谱带数 Bands number	多态性谱带数 Polymorphic bands number	染色体 Chromosome
26	RM80	TTGAAGGCCTGAAGGAG CATCAACCTCGICTTCACCG	4	2	8
54	RM223	GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC GAA GCAA GICTTGGCACTG	3	2	8
87	RM256	GACAGGGA GTGATTGAA GGC GTTGATTTCCCAA GGC	2	2	8
132	OSR32	CTCCAGCTTCGGCAACGICA CTTCTGTATCCATAAATCGT	3	2	12

3 讨论

PCD 是生物体内一种主动的、为了自身发育及抵抗不良环境需要而按照一定的程序结束生命的过程。由于植物 PCD 与发育及抗病等过程有密切关系,因此已成为生物学研究的热点^[1]。本研究初步筛选到 4 个与 PCD 相关基因有关的 SSR 引物,并将基因定位于水稻染色体 8 和 12。染色体 12 上的标记只有一个而且在染色体的末端,染色体 8 上的标记共有 3 个而且彼此距离较近。

本研究利用 159 个 SSR 引物,在双亲间得到 62 个稳定可靠的多态性引物。这些引物同形态学标记一样,可以作为一个位点在杂交分离群体中表现分离,并具有一定的分离比例。因此依据这些多态性标记和突变体性状,在分离群体中是否共分离或共分离的程度,可以找到与突变体基因紧密连锁的多态性标记,并将突变体基因精细定位。

References

- [1] Liu GZ(刘国振), Zhu L-H(朱立煌). Programmed cell death (PCD) in interactions of plant-pathogen. *Chinese Science Bulletin(科学通报)*, 1997, 42(11): 1129—1133
- [2] Anthony B B, Sara E P. Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 1997, 9:1169—1179
- [3] Susheng Gan, Richard M A. Making sense of senescence. *Plant Physiology*, 1997, 113: 313—319
- [4] Jean T G. Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:12094—12097
- [5] Gray J, Close P S, Briggs S P, Johal G S. A novel suppressor of cell death in plants encoded by the *Lls1* gene of maize. *Cell*, 1997, 89: 25—31
- [6] Hu G S, Yalpani N, Briggs S P, Johal G S. A porphyrin pathway impairment is responsible for the phenotype of a dominant disease lesion mimic mutant of maize. *The Plant Cell*, 1998, 10:1095—1105
- [7] Johal G S, Hulbert S, Briggs S P. Disease lesion mimic mutation of maize: a model for cell death in plants. *Bio Essays*, 1995, 17: 685—692
- [8] Dietrich R A, Delaney T P, Uknes S J, Ward E R, Ryals J A. Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 1994, 77: 565—577
- [9] Greenberg J T, Guo A, Klessing D G, Ausubel F M. Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, 1994, 77:551—563
- [10] Hu G, Richter T E, Hulbert S H, Pryor T. Disease lesion mimicry caused by mutations in the rust resistance gene *rpl*. *Plant Cell*, 1996, 8:1367—1376
- [11] Singh K, Multani D S, Khush G S. A new spotted leaf mutant in rice. *Rice Genetics Newsletter*, 1995, 12:192—193
- [12] Cheng Zhukuan, Gu Minghong. Morphology and inheritance of a new rice leaf death mutant. *Chinese Rice Research Newsletter*, 1998, 6(3): 2