

T-DNA (Ds) 插入产生的水稻卷叶突变的遗传分析

陈兆贵¹, 王江², 张泽民¹, 刘芳¹, 朱海涛¹, 宛新杉², 张景六², 张桂权¹

(¹ 华南农业大学 农学院, 广东省植物分子育种重点实验室, 广东 广州 510642

² 中国科学院 上海生命科学研究院, 植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 230002)

摘要: 在筛选和鉴定水稻 T-DNA (Ds) 插入纯合体的过程中, 观察到 1 个叶片卷曲的突变体. 对该突变体进行遗传分析表明, 分离群体出现叶片卷曲和叶片正常 2 种植株类型, 其分离比率为 3:1, 符合 1 对基因的显性遗传. Basta 抗性检测及 PCR 分子检测证实, 该突变体是由单一 T-DNA (Ds) 插入所引起的, 突变性状与 T-DNA (Ds) 共分离. 该突变材料可用于插入座位的基因克隆.

关键词: 水稻; 卷叶突变体; T-DNA 插入; 遗传分析

中图分类号: Q74

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2006) 01-0001-04

Genetic Analysis of a Rolled Leaf Mutation by T-DNA (Ds) Insertion in *Oryza sativa*

CHEN Zhao-gui¹, WANG Jiang², ZHANG Ze-min¹, LIU Fang¹,

ZHU Hai-tao¹, WAN Xin-shan², ZHANG Jing-liu², ZHANG Gui-quan¹

(¹ Guangdong Provincial Key Lab of Plant Molecular Breeding, College of Agriculture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China; ² Shanghai Institutes for Biological Sciences, Institute of Plant Physiology and Ecology,

State Key Lab of Plant Molecular Genetics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract A rolled leaf mutant *Oryza sativa* L. subsp. *japonica* IL39 caused by T-DNA (Ds) insertion was identified. Genetic analysis of the mutant showed that the two types of phenotype, rolled leaf and normal leaf in the segregating populations derived from the T-DNA (Ds) heterozygotes, fit the ratio of 3:1. Test for Basta resistance showed that the rolled leaf plants were all resistant while the normal leaf plants were susceptible. The ratio of resistant and susceptible plants is 3:1, which indicates that the rolled leaf mutant is co-segregated with Basta resistance. The rolled leaf mutant caused by T-DNA (Ds) insertion was further confirmed by T-DNA detection using PCR method. This rolled leaf mutant is useful for isolation of the tagged gene in rice.

Key words *Oryza sativa*; rolled leaf mutant; T-DNA insertion; genetic analysis

水稻是世界上重要的粮食作物之一,也是禾本科植物中分子生物学的模式植物. 随着水稻全基因组测序工作的快速发展^[1,2],如何破译全基因组测序所获得的遗传信息,分析基因的功能,是水稻功能基因组学所要解决的问题. 利用突变体分离和研究植物基因是非常有用的方法之一. 除了可以利用

物理诱变和化学诱变等方法获得突变体外,还可以用 T-DNA 和转座子插入等方法诱导产生突变体,通过插入标签法来分离植物基因^[3-8]. 把玉米的转座子 Ac (Activator 激活因子) 和 Ds (Dissociator 解离因子) 引入水稻基因组中,构建水稻转座子插入突变体库,对于研究水稻基因组的功能具有重要的意义^[7,9-10].

收稿日期: 2005-03-02

作者简介: 陈兆贵 (1973), 男, 博士, 现在广东省惠州学院理学系工作; 通讯作者: 张桂权 (1957), 男, 教授, 博士, E-mail: gqzhang@scau.edu.cn

基金项目: 国家重点基础研究规划 (G19990116); 广东省自然科学基金 (04020564)

中国科学院上海植物生理生态研究所通过农杆菌介导法将改建过的 Ds 转入水稻中花 11 号品种中, 构建了一个携带 T-DNA (Ds) 的水稻转化群体, 并获得了一些表型变异的材料, 变异的性状主要包括黄化苗、白化苗、条纹苗、矮化、不育性和株型变异等, 但关于插入突变体遗传分析的报道还不多^[11-15]. 本文报道一个由 T-DNA (Ds) 插入所引起的卷叶水稻突变体, 并对突变体进行了遗传分析, 为进一步克隆该基因并进行功能分析奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用的 Ds 转化材料是粳稻 *Oryza sativa* L. subsp. *japonica* 中花 11 号. T₁ 代 Ds 转化株系由中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所提供. 用于转化的质粒 pD3Bar1300 在 T-DNA 区中携带 Ds 转座子, Ds 的内部插入 Bar 基因, 能提供对 Basta (商用除草剂, 有效成分为 phosphinothricin PPT 膦丝菌素) 的抗性, 在 Ds 的旁侧插入潮霉素磷酸转移酶基因 *Hpt* 能提供对潮霉素的抗性^[11].

1.2 Basta 抗性鉴定

在水稻分蘖期和抽穗期共进行 2 次 Basta 检测, Basta 检测参见陈兆贵等^[14]的方法.

1.3 PCR 检测

PCR 检测参见陈兆贵等^[14]的方法. 所用引物为 DsP1 (GGAAGCTTGG ATGAAAACGG TCGTAACG) 和 DsP2 (GGGAATTCTG AAGATGTAGC AAGTGGCTCC).

1.4 突变体的种植

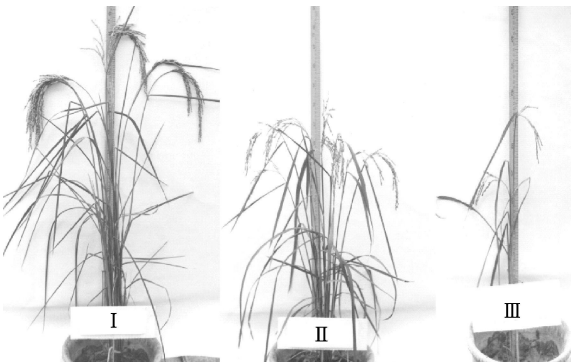
材料于 2000~2001 年种植在华南农业大学教学农场. 2000 年早季, 种植 Ds 转化株系 T₁ 代, 每个株系种植 20 个左右单株, 筛选表型变异的材料. 2000 年晚季至 2001 年晚季, 每季种植 3 个群体的突变体材料, 每个群体种植 50 株以上, 用于突变体的遗传分析.

2 结果与分析

2.1 卷叶突变体的性状表现

在 T₁ 代, 对 Ds 插入株系 (insertion lines ILs) 进行全生育期观察, 从中筛选到 1 个叶片卷曲的材料, 株系编号为 IL39. IL39 最早在苗期就可以观察到卷叶突变. 在整个生长期, 突变体植株生长不良, 叶子披垂, 叶片向外卷曲, 突变植株比正常的植株矮小, 分蘖少; 在抽穗成熟期, 突变体植株的穗子较短, 结实率低. 根据叶片卷曲的程度不同, 可以把突变体植株分为 2 类: 一类为叶子卷曲程度大一些, 后代不出

现性状的分离, 为卷叶纯合体; 另一类叶子卷曲程度小一些, 后代出现卷叶与非卷叶植株的分离, 为卷叶杂合体 (图 1).



I : 正常植株; II : 卷叶杂合体
I : normal plant II : heterozygote of rolled leaf mutant
III: homozygote of rolled leaf mutant
图 1 IL39 卷叶突变体的表型

Fig 1 The phenotypes of the rolled leaf mutant IL39

2.2 突变性状的遗传

从 T₂ 代开始, 连续 3 个世代对 IL39 的突变性状进行了遗传分析 (表 1). 结果表明: 在不同世代, 分离群体均出现 3:1 的卷叶和正常叶的分离, 说明突变性状能稳定遗传, 是可遗传的变异; 在同一分离世代, 不同株系的植株均出现卷叶和正常叶 2 种类型, 分离比率符合 3:1, 表明卷叶突变是由 1 对基因所控制.

表 1 IL39 卷叶突变性状的分离
Tab. 1 Segregation of the rolled leaf phenotype in the populations derived from the heterozygotes of mutant IL39

世代 generation	株数 no. of plants			χ^2 (3:1)	P
	合计	卷叶	正常		
	total	rolled leaf	normal leaf		
T ₂	165	117	48	1.26	0.25~0.50
T ₃	386	275	111	2.71	0.10~0.25
T ₄	240	173	67	0.94	0.25~0.50

2.3 突变性状与 Ds 共分离

在 T₂~T₄ 代, 对 IL39 的 Basta 抗性进行了遗传分析. 结果 (表 2) 表明: 在不同的分离世代, 杂合体分离群体 Basta 的抗感分离比率符合 3:1, 符合单基因的遗传模式, 表明 Bar 基因是以单拷贝方式插入到水稻染色体上, 并能稳定遗传给后代.

对 IL39 突变体的 T₂~T₄ 代的表型和 Basta 抗性的遗传分析表明, 凡是叶片卷曲的植株均表现为抗 Basta 而叶片正常的植株均表现出对 Basta 的敏感

(表 3), 这表明卷叶突变与 Basta 抗性共分离。

表 2 卷叶突变体分离群体中 Basta 抗性的分离

Tab. 2 Segregation of the Basta resistance in the populations derived from the heterozygote of IL39

世代 generation	株数 no. of plants			χ^2 (3:1)	P
	合计	抗	感		
	total	resistant	susceptible		
T ₂	165	117	48	1.26	0.25 ~ 0.50
T ₃	386	275	111	2.71	0.10 ~ 0.25
T ₄	240	173	67	0.94	0.25 ~ 0.50

表 3 卷叶突变性状与 Basta 抗性的共分离

Tab. 3 Co segregation of the rolled leaf and Basta resistance in the populations derived from the mutant IL39

Basta 抗性 Basta resistance	世代 generation	卷叶 rolled leaf	正常 normal leaf	合计 total
抗 resistant	T ₂	117	0	117
	T ₃	275	0	275
	T ₄	173	0	173
感 susceptible	T ₂	0	48	48
	T ₃	0	111	111
	T ₄	0	67	67
合计 total		575	226	801

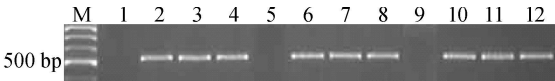
2.4 突变体的 PCR 扩增带型

为了进一步从分子水平验证 IL39 卷叶突变性状与 Ds 转座子之间存在共分离关系, 用 Ds 转座子内部的 1 对引物 DsP1 和 DsP2 对 IL39 部分植株进行 PCR 扩增(表 4)。结果表明: 表现出对 Basta 抗性的卷叶植株, 均能检测出 1 条 500 bp 的特异带; 而表现出对 Basta 敏感的叶片正常的植株, 不能扩增出这一特异的 DNA 条带(图 2)。表明突变性状是由 Ds 插入引起的。

表 4 突变分离群体中 Ds 的 PCR 检测

Tab. 4 Ds detection in the populations derived from the mutant IL39 by PCR method

表型 phenotype	Ds检测株数 No. of plants of Ds detection		合计 total
	有 present	无 absent	
卷叶 rolled leaf	115	0	115
正常 normal leaf	0	57	57
合计 total	115	57	172



M 是 100 bp ladder; 泳道 1、5 和 9 其模板是正常植株 DNA; 泳道 2~4、6~8 和 10~12 其模板是卷叶植株

M = 100 bp ladder; Sample 1, 5 and 9 are normal plants; Sample 2-4, 6-8 and 10-12 are rolled leaf mutants

图 2 卷叶杂合体后代植株的 Ds 带型

Fig. 2 Ds detection in the segregates derived from the heterozygote of IL39 by PCR

根据上述结果可以认为, 在突变体 IL39 中, 由于 T-DNA (Ds) 的插入导致了一个控制叶型的基因发生了突变, 使该基因的功能发生了改变, 致使突变体表现出卷叶。

3 讨论与结论

用转座子 Ac/Ds 插入等方法构建突变库已成为植物功能基因组学研究的一个重要组成部分^[16], 而筛选和鉴定各种类型的突变体, 是分离植物基因和分析基因功能的基础性工作。通过对水稻 T-DNA (Ds) 插入纯合体的筛选和鉴定, 我们已获得了一批水稻 T-DNA (Ds) 插入的纯合体^[14]。在此基础上, 本研究获得了一个由 T-DNA (Ds) 插入所引起的水稻卷叶突变体, 根据对该突变体进行表型观察、遗传分析、Basta 抗性检测和 Ds 的 PCR 检测的结果, 可以得到以下几点结论: (1) IL39 为卷叶突变体, 卷叶是由于基因突变所引起的; (2) 对卷叶突变体进行遗传分析, 表明突变性状为单基因突变的结果, 为单基因显性遗传; (3) 该基因的突变是由 T-DNA (Ds) 插入所引起的, T-DNA (Ds) 的插入引起正常叶基因失活, 从而产生表型变异。

前人对于 T-DNA (Ds) 插入突变体的遗传分析研究, 主要集中在拟南芥、番茄和水稻等植物。Long 等^[3]报道获得 7 个 Ds 插入的拟南芥突变体, 其中 6 个突变体的突变性状与 Ds 共分离, 另一个突变体的突变性状与 Ds 不完全连锁, 遗传距离为 11.6 cM; Erik 等^[6]报道了 3 个与 Ds 共分离的番茄插入突变体; 在水稻中, Izawa 等^[9]报道获得 Ds 插入突变体材料, 多数表现为与 T-DNA (Ds) 插入无关; 王新其等^[12]和张梅芳等^[13]报道获得了水稻突变体材料, 并作了遗传分析。本研究通过表型筛选的方法鉴定了 1 个水稻卷叶突变体, 遗传分析结果表明, 突变性状表现出与 Ds 共分离, 因此 Ds 因子可以作为分子标签来分离控制该性状的基因。

水稻的叶片卷曲是与水稻叶型或株型直接相关的性状。适度的叶片卷曲能保持叶片直立而不披垂, 在生长后期有利于改善水稻基部的受光条件, 提高

光能利用率, 但叶片过度卷曲将会产生许多不利的影响. 对于水稻卷叶的变异, 前人作了一些研究, 多数研究报道卷叶变异是受隐性基因所控制的, 也有报道卷叶性状表现为不完全显性突变, 并对一些卷叶基因进行染色体定位工作^[17]. 本研究获得了一个卷叶突变体, 对控制该性状基因的克隆, 了解该基因的表达调控将具有理论意义.

参考文献:

- [1] SASAKI T, MATSUMOTO T, YAMAMOTO T et al. The genome sequence and structure of rice chromosome 1[J]. *Nature*, 2002, 420: 312-316.
- [2] FENG Q, ZHANG Y, JIAO B et al. Sequence and analysis of rice chromosome 4[J]. *Nature*, 2002, 420: 316-320.
- [3] LONG D, MARTIN M, SUNDERG M. The maize transposon element system *Ac/Ds* as a mutagen in *Arabidopsis*. Identification of an albino mutation induced by *Ds* insertion[J]. *Genetics*, 1993, 90: 10370-10374.
- [4] MARK G M, AARTS M, WILM G D. Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*[J]. *Nature*, 1993, 363: 715-717.
- [5] JAMES DW, LIME KEILLER J et al. Directed tagging of the *Arabidopsis* fatty acid elongation1 (fael) gene with the maize transposon activator[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7: 309-329.
- [6] ERK A, van DER B, BAS F et al. Identification of the *FEEBLY* gene from tomato by transposon tagging[J]. *Mol Gen Genet*, 1996, 251: 267-280.
- [7] HIROYUKI E, TAKESHI I, MITSUKO K. *Ac* as a tool for the functional genomic of rice[J]. *The Plant J*, 1999, 19(5): 605-613.
- [8] HIRUCHIKA H, MIYAO M, YAMAZAKI S. Retrotransposons of rice as a tool for the functional analysis of genes[J]. *Rice Genetics*, 2001, 4: 279-292.
- [9] IZAWA T, OHNISHI T, NAKANO T. Transposon tagging in rice[J]. *Plant Mol Biol*, 1997(35): 219-229.
- [10] RAMACHANDRAN S, SUNDARASAN V. Transposons as tools functional genomics[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2001, 39: 243-252.
- [11] 王江, 李琳, 宛新杉, 等. 插入玉米 *Ds* 转座因子的水稻转化群体及其分子分析[J]. *植物生理学报*, 2000, 26(6): 501-506.
- [12] 王新其, 殷丽青, 沈革志. 水稻矮秆突变体的遗传分析[J]. *上海农业学报*, 2002, 18(2): 19-23.
- [13] 张梅芳, 张景六. 插入含 *Ds* 因子的 *T*-DNA 产生的水稻脆秆突变株的遗传和分子分析[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2002, 28(2): 111-116.
- [14] 陈兆贵, 王江, 张泽民, 等. 水稻 *Ds* 插入纯合体的筛选和鉴定[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2003, 29(4): 337-341.
- [15] 陈兆贵, 王江, 张泽民, 等. *T*-DNA(*Ds*) 插入引起的水稻迟抽穗突变体的遗传分析[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2004, 30(1): 75-80.
- [16] MARTIENSEN A R. Functional genomic probing plant gene function and expression of *T*-DNA insertion mutation in *Arabidopsis* actin mutants act4-1[J]. *The Plant J*, 1998, 8: 613-622.
- [17] 李仕贵, 马玉清, 何平, 等. 一个未知卷叶基因的识别和定位[J]. *四川农业大学学报*, 1998, 16(4): 391-393.

【责任编辑 周志红】