

杨婉婷, 孙丙耀. 水稻 Ds 插入稃片失绿突变体的初步鉴定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 58–61.

水稻 Ds 插入稃片失绿突变体的初步鉴定

杨婉婷, 孙丙耀

(苏州大学医学部基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215123)

摘要:对 Ac/Ds 基因捕获系统筛选到的 1 例水稻稃片失绿突变体进行失绿表型、主要光合色素含量分析, 基于 PCR 技术对突变体基因组 Ac 和 Ds 元件插入进行鉴定, 利用 TAIL-PCR 技术分离 Ds 侧翼序列, 经在线数据库比对分析 Ds 插入的染色体定位, 利用生物信息学软件预测 Ds 元件下游基因的结构。结果显示, 该突变体为含 Ac 和 Ds 双元件的 Ds 插入突变体, 其失绿表型仅限于抽穗后的外稃和内稃, 稃片内叶绿素 a、b 和类胡萝卜素含量均显著低于野生型稃片; 基于 TAIL-PCR 技术和 Ds 侧翼序列分析发现, 该突变体基因组上含 Ds 双拷贝插入, Ds 元件分别插入于突变体水稻第 3 和第 12 号染色体上; 推测位于第 3 号染色体上的 Ds 插入可能对其下游基因的表达产生影响, 该稃片失绿突变体在失绿表型、相关基因染色体定位上均明显不同于业已报道的白穗突变体。

关键词:水稻; 稃片失绿; Ds 插入; 光合色素; TAIL-PCR

中图分类号: Q319⁺.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0058-03

光合色素相关突变体的挖掘和鉴定是研究光合色素代谢途径、光合作用分子机制的重要遗传材料。大量研究显示, 有关光合色素缺陷型突变体的报道较多的主要为叶色突变体, 而关于水稻等禾本科植物的稃片存在光合色素缺陷的报道很少。尽管稃片(包括内稃和外稃)通常被看作水稻等禾本科植物小花的重要组成部分, 但它与叶片、叶鞘等营养器官一样含有叶绿体, 并可能在提高水稻的产量中发挥其重要作用^[1]。因此, 利用稃片色素缺陷型突变材料进行相关的发育、生理、遗传学研究具有重要意义。Sanchez 等较早报道了 2 例水稻成熟期白穗突变体(*wpl* 和 *wp2*)^[2], 李红昌等从水稻粳杂交 F₆ 后代自然群体中获得 1 例白穗突变体 *wp(t)*, 并推测与 *wp2* 属于同一类突变体^[3], 金怡等从粳稻组培后代中发现 1 例突变体 *wslup* 在苗期叶片呈白条纹、抽穗期白穗、成熟后叶色及稃片颜色可转至正常^[4], 何颖红等发现温敏型白条叶突变体在高温条件下出现穗部变白现象^[5]。

本研究利用 Ac/Ds 基因捕获系统筛选到 1 株水稻稃片失绿的 Ds 插入突变体, 从稃片失绿表型、主要光合色素含量以及 Ds 插入相关基因的染色体定位等方面对该突变体进行初步鉴定, 为揭示 Ds 标记基因在稃片光合色素代谢中的作用提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

试材为 Ac/Ds 基因捕获系统产生的水稻品种 Dongjin (*Oryza sativa* L. var. *japonica* cv. Dongjin) 的稃片失绿突变体。

收稿日期: 2013-03-04

基金项目: 江苏省苏州市应用基础研究计划(农业部分)(编号: SYN201204)。

作者简介: 杨婉婷(1987—), 女, 湖北人, 硕士, 研究方向为植物结构与发育生物学。E-mail: ywt878025@qq.com。

通信作者: 孙丙耀, 副教授, 主要从事植物分子遗传学研究。Tel: (0512)65882833; E-mail: sunbingyao@suda.edu.cn。

5 月中旬, 将该突变体种子播种于江苏太湖地区农业科学研究所试验地, 6 月中旬大田移栽, 植株生长发育各阶段施以常规的肥水管理。

1.2 突变体失绿表型的形态观察

于抽穗期比较观察大田栽培的野生型和突变体失绿相关表型的差异, 剪取穗部, 采用 LA-S 全能型植物图像分析系统扫描分析失绿表型。

1.3 叶绿素和类胡萝卜素含量测定

抽穗期采集野生型与突变体植株稻穗, 取稃片剪成 2~3 mm 宽的小块, 每份取 200 mg, 重复 3 次; 将样品浸泡于含 20 mL 无水乙醇与丙酮(1:1)混合液的具塞试管中, 25~30 ℃ 避光萃取 24 h, 其间混匀多次; 7 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 U-3010 型分光光度计测定 663、645、470 nm 处吸光度, 按 Arnon 法修正公式^[6-7]和 Lichenthaler 方法^[8], 计算稃片单位鲜重叶绿素和类胡萝卜素含量。

1.4 水稻基因组 DNA 提取

采用胍法^[9]并做少许改进提取水稻叶片基因组 DNA。取保存于 -70 ℃ 超低温冰箱中的叶片 2~3 cm², 适当剪碎, 置于 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入液氮, 用带有枪头的电钻迅速将水稻叶片研磨至粉状, 加 500 μL DNA 提取缓冲液(7 mol/L 胍, 50 mmol/L EDTA, 2% SDS, pH 值 7.5), 37 ℃ 水浴振荡 15 min; 加入 500 μL PCI(饱和酚: 氯仿: 异戊醇 = 25: 24: 1)继续振摇 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液; 加入与上清液等体积的 PCI, 充分涡旋混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液; 再加 0.6 倍体积的异丙醇缓慢颠倒混匀后, 室温下静置 5 min 沉淀基因组 DNA, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加 500 μL 70% 乙醇洗涤, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃乙醇, 洗涤 2 次, 室温干燥后, 溶于 50 μL 1×TE 溶液中。根据分光光度计测定的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比率, 计算所提取基因组 DNA 的浓度和纯度, 将达到较高纯度的基因组 DNA 作为 Ac/Ds 插入的 PCR 检测和 TAIL-PCR 模板。

1.5 引物

采用常规 PCR 技术进行突变体基因组上 Ac/Ds 双元件

插入分析,并利用 TAIL-PCR 技术扩增 Ds 元件的侧翼序列, 相关引物见表 1。

表 1 用于 Ac/Ds 双元件插入分析和 Ds 侧翼序列扩增的 PCR 引物

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
Ac1031	ATAAGATTGGCCAAGTIGATGTC	Ac/Ds 双元件插入分析上游引物
Ac1543a	TTCTTGCTGAAATGCTGCCATAC	Ac/Ds 双元件插入分析下游引物
AD	TCTTTCGNACITNGGA	TAIL-PCR 随机简并引物
SP1	CCCCGTTTCGTTTTCGTTACCGGTATATCCCGTTTTCG	TAIL-PCR 第 1 轮扩增特异引物
SP2	TATGAAAATGAAAACGGTAGAGG	TAIL-PCR 第 2 轮扩增特异引物
SP3	GTTACCGACCGTTTTCATCC	TAIL-PCR 第 3 轮扩增特异引物

1.6 Ac/Ds 插入的 PCR 鉴定

冰浴条件下,在 0.2 mL 的薄壁管中建立 20 μ L 的 PCR 反应体系,反应体系中加入 2.0 μ L 10 \times PCR 缓冲液、1.6 μ L dNTPs,浓度为 10 μ mol/L 的上游引物 Ac1031 和下游引物 Ac1543a 各 1.0、0.2 μ L Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)以及约 100 ng 基因组 DNA。循环参数设置为:94 $^{\circ}$ C 下预变性 4 min;接着进行 35 个循环反应,每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s、58 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 150 s;最后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。反应在 PTC-200 型 PCR 仪上进行,反应结束后,取反应产物 6 μ L 上样于 2% 琼脂糖凝胶进行电泳分析,根据特异产物的大小鉴定 Ac/Ds 转座元件的插入情况^[10]。

1.7 Ds 侧翼序列的 TAIL-PCR 扩增和序列测定

利用 TAIL-PCR 技术扩增 Ds 插入元件的侧翼序列, TAIL-PCR 各轮反应体系和循环参数均参照文献^[11],以 AD 引物分别与特异引物 SP1、SP2、SP3 结合建立 TAIL-PCR 的 3 轮反应;反应结束后,取第 2、3 轮反应产物在浓度为 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分离,根据两轮反应产物的大小从凝胶中切出第 3 反应产物中的特异条带,采用 QIAGEN 的 QIA quick Gel Extraction Kit 从胶中回收侧翼于 Ds 的特异片段;将该片段连接到 pMD19-T 载体上,经转化大肠杆菌 DH5 α 菌株、蓝白斑筛选、菌液 PCR 分析,以第 3 轮反应的特异引物为测序引物进行 Ds 侧翼序列的测定,序列测定委托上海生工生物有限公司完成。

1.8 Ds 插入位点分析

以所测定的 Ds 侧翼序列为待查核苷酸序列,通过 NCBI-BLAST 检索系统,获得与 Ds 侧翼序列同一性最高的

水稻基因组 DNA 序列,确定 Ds 在水稻基因组上的插入位置,利用 FGENESH 数据库推测被插入基因的结构,获得其编码的氨基酸序列,利用 NCBI Entrez server 和 Pfam 软件在线分析预测基因所编码的蛋白功能。

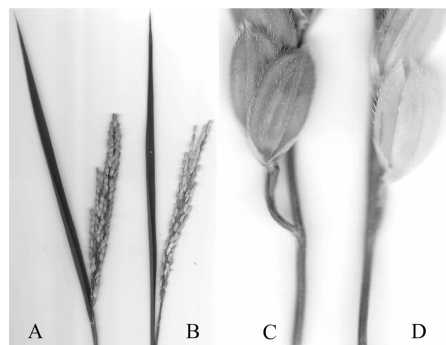
2 结果与分析

2.1 突变体稈片的失绿表型

由图 1 可见,与野生型相比,大田自然生长条件下的突变体叶片、穗轴均呈正常绿色,而内稈和外稈失绿呈白色。

2.2 野生型和突变体稈片叶绿素和类胡萝卜素含量比较

由表 2 可见,与野生型相比,失绿突变体稈片中叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量均显著低于野生型,这表明突变体稈片失绿表型与叶绿素类、类胡萝卜素光合色素含量的显著下降有关。



A、C 为野生型; B、D 为突变体

图 1 突变体稈片的失绿表型

表 2 野生型与突变体稈片中叶绿素与类胡萝卜素含量

材料	叶绿素 a (mg/g)	叶绿素 b (mg/g)	总叶绿素 (mg/g)	类胡萝卜素 (mg/g)
突变体	0.076 \pm 0.015	0.028 \pm 0.007	0.104 \pm 0.015	0.031 \pm 0.010
野生型	0.561 \pm 0.012 **	0.193 \pm 0.005 **	0.754 \pm 0.016 **	0.147 \pm 0.006 **

注: ** 表示差异极显著($P < 0.01$)。

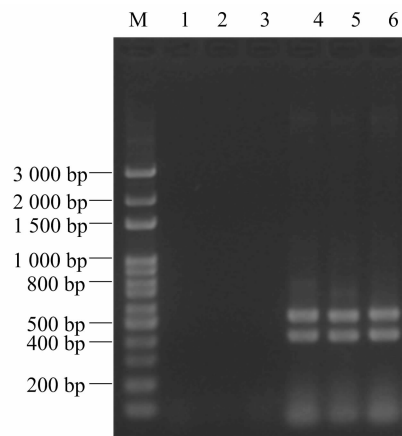
2.3 稈片失绿突变体基因组含 Ac 和 Ds 双元件插入

根据 Ac 和 Ds 元件核苷酸序列设计 1 对特异引物 Ac1031 和 Ac1543a,以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,可以分析基因组 DNA 上是否含有 Ac 或 Ds 元件的插入。若仅扩增出大小约 400 bp 的特异条带,表明基因组 DNA 中仅含 Ac 元件;若只扩增出大小约 500 bp 的特异条带,则表明基因组 DNA 中仅含 Ds 元件;若同时扩增出这 2 个特异条带,则表明基因组中含 Ac/Ds 双元件。由图 2 可见:随机选取野生型和稈片失绿突变体植株,以其基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,野生型植株基因组 DNA 中不含 Ac 或 Ds 元件,而稈片

失绿突变体基因组中含有 Ac/Ds 双元件,表明该突变体为 Ds 插入突变体。

2.4 Ds 在突变体基因组上的插入位点及其下游基因结构

以稈片失绿突变体基因组 DNA 为模板进行 TAIL-PCR 反应,扩增了侧翼于 Ds 元件的特异产物(图 3),洗脱回收其中 2 个条带(图 3 箭头所指),经与 T 载体连接后进行序列测定,得到了大小与序列不同的 2 个 Ds 侧翼序列。以所测得的较短序列(对应于图中箭头所指的较小片段)进行 NCBI-BLAST 同源比对,结果显示,该 Ds 侧翼序列与水稻第 3 号染色体上的克隆 B1339A06 (GenBank: AC148339.1; GI:

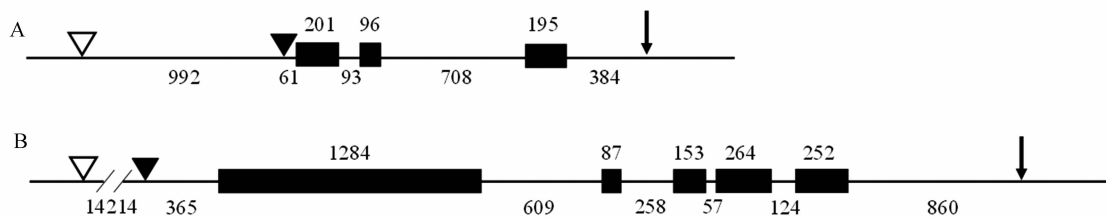


M: Plus 100 bp DNA Ladder Marker; 以基因组DNA为模板进行PCR反应检测Ac/Ds元件在基因组上的插入,泳道1~3为野生型,泳道4~6为突变体。

图2 突变体基因组Ac/Ds元件PCR分析的电泳检测

42761480)序列高度一致,而以测得的较长序列(对应于图中箭头所指的较大片段,约1.3 kb)进行NCBI-BLAST在线比对,发现其与第12号染色体上的BAC克隆OSJNBa0030G16(GenBank:AL713943.3;GI:22003255)序列高度一致,这表明该突变体基因组上含双拷贝的Ds元件,Ds分别插入于水稻的第3号和第12号染色体上。

以Ds插入位点为基点,分别从相关克隆获取Ds插入位点下游的长序列,用FGENESH软件预测长序列中所含基因的结构信息发现,2个Ds插入位点均为非编码序列(图4)。

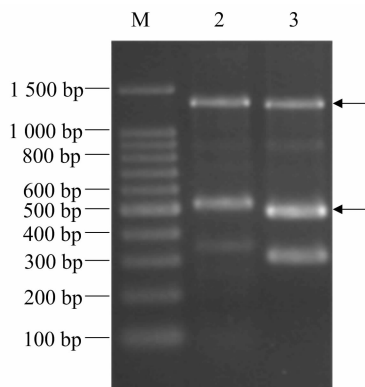


A、B分别为插入于水稻第3号染色体和第12号染色体上的Ds插入部位及其下游基因结构;空心三角形所指为Ds插入部位,黑色三角形所指为Ds元件下游基因的转录起始部位(TSS),黑色方块为外显子、相邻方块间的连线为内含子;下向箭头所指为基因的多聚腺苷酸尾(PloyA)部位。数字表示相关元件的大小(bp),外显子大小标示在黑色方块上部,内含子或其他元件的大小标示在连线的下部。

图4 Ds插入部位及下游基因预测结构

3 小结与讨论

Sanchez等报道的2例白穗突变体 $wp1$ 和 $wp2$ 的主要特征大致相同,它们成熟植株的穗呈白色,基部3个叶片具白色条斑,不同的是, $wp1$ 突变体的穗轴和小梗表现为绿色,而 $wp2$ 的穗轴和小梗均呈白色^[2]。李红昌等报道的白穗突变体,在成熟植株基部少数叶片中脉呈白色,抽穗后内外稃和枝梗均为白色^[3]。本研究报道水稻突变体在表型上仅限于稃片失绿、白化,而其他绿色器官均发育正常,在突变相关基因的染色体定位上,上述 $wp1$ 基因定位于水稻第7号染色体上,李红昌等报道的白穗突变基因定位于第1号染色体上,而本研究定位的稃片失绿相关基因定位于第3号染色体上,该突变体在表型、来源和相关基因的染色体定位上不同于业已报道的白穗突变体,同时,该突变体为Ds插入突变体,PCR鉴



M: 分子量标记(100 bp DNA ladder, TaKaRa); 2、3分别指TAIL-PCR第2和第3轮反应产物。黑色箭头所指为凝胶回收的特异条带

图3 突变体基因组中Ds侧翼序列的TAIL-PCR扩增

FGENESH预测结果显示,在第3号染色体上Ds插入于其下游基因的转录起始位点之前992 bp处,该基因含3个外显子(图4-A),编码164个氨基酸,利用其预测的氨基酸序列进行基于NCBI Entrez server和Pfam软件在线比对,推测该基因编码产物为遍在胁迫蛋白(USP)家族成员。基于上述分析方法,插入于第12号染色体上的Ds元件离其下游基因较远,与该下游基因的转录起始位点相距约14.2 kb(图4-B),推测Ds在第12号染色体上的插入通常不会受下游基因表达产生影响。

定发现其还有Ac/Ds双元件,由于Ds元件可以在Ac编码的转座酶作用下从原位切离^[12],这为后续进行回复体的筛选和遗传分析提供了便利。

失绿突变体稃片中叶绿素a、叶绿素b以及类胡萝卜素含量均显著低于野生型,而其叶片仍呈正常的绿色,这可能意味着稃片和叶片中光合色素代谢途径中相关基因的表达和调控存在差异。Ds转座元件的大小约为4.6 kb,突变体中第3号染色体上Ds元件尽管未插入基因内部,但由于其离下游基因的转录起始位点很近,可能影响了该基因在转录水平的表达。至于该下游基因编码的遍在胁迫蛋白(USP)家族成员是否在稃片光合色素合成中发挥着关键作用有待深入研究。

参考文献:

[1]李寒冰,胡玉熹,白克智,等. 水稻稃片和旗叶叶绿体超微结构及

李文西,张月平,毛伟,等. 水稻磷肥施用效果、经济效益及推荐用量[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):61-63.

水稻磷肥施用效果、经济效益及推荐用量

李文西¹, 张月平¹, 毛伟¹, 龚鑫鑫¹, 高晖¹, 吴东平²

(1. 江苏省扬州市土壤肥料站, 江苏扬州 225101; 2. 江苏省扬州市邗江区朴席镇农业综合服务中心, 江苏扬州 225101)

摘要:2012 年在江苏省扬州市邗江区朴席镇布置了磷肥用量控制试验, 研究磷肥施用对水稻生长、产量及经济效益的影响。结果表明: 磷肥施用对水稻株高、结实率、千粒重影响较小, $N_2P_0K_2$ 、 $N_2P_{1.5}K_2$ 、 $N_2P_2K_2$ 、 $N_2P_{2.5}K_2$ 、 $N_2P_3K_2$ 处理的水稻总穗数、每穗总粒数均高于 $N_2P_0K_2$ 处理, 部分处理间差异显著。 $N_2P_1K_2$ 、 $N_2P_{1.5}K_2$ 、 $N_2P_2K_2$ 、 $N_2P_{2.5}K_2$ 、 $N_2P_3K_2$ 处理的水稻理论产量、实际产量分别比 $N_2P_0K_2$ 处理增加 4.6% ~ 18.8%、2.9% ~ 17.6%。采用线性加平台模型拟合推荐试验条件下磷肥用量为 61.2 kg/hm², $N_2P_2K_2$ 处理的经济效益最佳, 氮磷钾肥合理配施能够增加收入, 提高经济效益。

关键词: 水稻; 产量; 磷肥; 推荐用量; 经济效益

中图分类号: S143.2; S511.06 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0061-03

水稻是我国主要的粮食作物, 占全国粮食种植面积的 28.7%^[1]。水稻生长受土壤、环境、水利等多种条件的影响, 合理施肥是提高水稻产量的重要措施^[2-5]。近年来, 随着水稻产量的不断增加, 化肥尤其磷肥盲目过量施用依然普遍, 较少考虑或未考虑土壤养分、盲目施用高浓度复合肥的现象仍然存在, 农业周围环境存在着较大的污染威胁。为更好地指导农民科学施肥, 增产增收, 笔者开展了磷肥用量控制试验, 分析了磷肥施用对水稻生长、产量、经济效益的影响, 采用线性加平台模型拟合推荐合理的磷肥用量, 为水稻科学施肥提供借鉴。

收稿日期: 2013-03-20

基金项目: 全国耕地质量保护项目(编号: 农财发[2012]49 号); 国家测土配方施肥项目; 江苏省扬州市“绿扬金凤计划”项目(编号: 2011YB077)。

作者简介: 李文西(1983—), 男, 河南南阳人, 博士, 主要从事土壤肥料新技术推广研究。E-mail: xixi05044@163.com。

低温(77K)荧光发射光谱的研究[J]. 电子显微学报, 2002, 21(3): 341-344.

[2] Sanchez A C, Khush G S. Chromosomal location of some marker genes in rice using the primary trisomics[J]. Journal of Heredity, 1994, 85(4): 297-300.

[3] 李红昌, 钱前, 王赞, 等. 水稻白穗突变体基因的鉴定和染色体定位[J]. 科学通报, 2003, 48(3): 268-270.

[4] 金怡, 刘合芹, 汪得凯, 等. 一个水稻苗期白条纹叶及抽穗期白穗突变体的鉴定和基因定位[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(5): 461-466.

[5] 何颖红, 邹国兴, 饶玉春, 等. 水稻白条纹突变体(st10)的遗传分析与基因定位[J]. 分子植物育种, 2011, 9(2): 136-142.

[6] 苏正淑, 张宪政. 几种测定植物叶绿素含量的方法比较[J]. 植物生理学通讯, 1989(5): 77-78.

[7] Arnon D J. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in beta vulgaris[J]. Plant Physiology, 1949, 24(1): 1-15.

1 材料与方法

1.1 试验区概况

试验区位于江苏省扬州市邗江区朴席镇(119°19'35"E, 32°18'43"N), 地处长江中下游北岸。该地区属亚热带湿润气候, 光照充足, 降水充沛, 年均降水量约 1 000 mm, 年均气温 15.0℃, 雨热同期。供试土壤为长江冲积物发育潮土, 土壤类型为沙底淤泥土, 耕作层土壤 pH 值 6.7, 有机质含量 31.2 g/kg, 全氮含量 1.1 g/kg, 有效磷含量 9.3 mg/kg, 速效钾含量 89.5 mg/kg^[6]。

1.2 供试材料

供试水稻品种为南粳 5055(*Oryza sativa* subsp. *keng*), 试验开始于 2012 年 6 月 5 日, 2012 年 10 月 26 日结束。2012 年 6 月 5 日整田, 6 月 13 日插秧, 9 月 3 日水稻齐穗, 10 月 26 日考种、测产。

1.3 试验设计

试验共设置 8 个处理, 分别为 $N_2P_0K_2$ (无磷区)、 $N_2P_1K_2$ 、

[8] Lichtenthaler H K, Wellburn A R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents[J]. Biochemical Society Transactions, 1983, 11(5): 591-592.

[9] Kang T J, Yang M S. Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants[J]. BMC biotechnology, 2004(4): 20.

[10] 孙丙耀, 谈建中, 陆小平, 等. 水稻 Ac × Ds 后代基因组 DNA 中 Ds 侧翼序列的扩增及其 Ds 插入分析[J]. 遗传, 2006, 28(12): 1555-1561.

[11] Sun B Y, Piao H L, Park S H, et al. Selection of optimal primers for TAIL-PCR in identifying Ds flanking sequences from Ac/Ds insertion rice lines[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 20(6): 821-826.

[12] Chin H G, Choe M S, Lee S H, et al. Molecular analysis of rice plants harboring an Ac/Ds transposable element-mediated gene trapping system[J]. Plant Journal, 1999, 19(5): 615-623.