

水稻矮化突变体 G 蛋白 α 亚基基因的结构和表达*

费小雯¹, 邓晓东², 王永胜¹, 刘良式¹, 徐增富¹

(1. 中山大学基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南 海口 571101)

摘要: 利用 γ -Co⁶⁰ 辐射诱发水稻特光矮-2 (*Oryza sativa* L. cv. TGA-2) 产生变异, 获得一种稳定遗传的新型水稻矮化突变体 *dwarf69*。*dwarf69* 和 TGA-2 及其杂交后代 F₁、F₂、F₃ 成熟期的株高数据表明矮化表型受一对隐性基因控制。进一步研究发现, 虽然 *dwarf69* 和 TGA-2 的 G 蛋白 α 亚基基因 (Rice G protein alpha-subunit, *RGA*) 编码区核苷酸序列只有一个核苷酸的差异, 但 *RGA* 在野生型 TGA-2 中的表达量明显高于在突变体 *dwarf69* 中的表达量。对矮化突变体 *dwarf69* 和野生型 TGA-2 的 *RGA* 基因 5' 上游区的序列分析表明, *dwarf69 RGA* 5' 上游区比 TGA-2 *RGA* 5' 上游区多出 1 076 bp。首次报道水稻矮化突变体中的 *RGA* 5' 上游区序列与其野生种的 *RGA* 5' 上游区序列存在显著的差异。

关键词: 水稻; 矮化突变体; G 蛋白 α 亚基; 5' 上游区

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 01-0070-05

突变体是研究植物生长发育机理的重要材料。用矮化突变体进行研究对于阐明植物茎的生长发育及其调节机理有着十分重要的意义, 并可能在植物育种中有着实际的应用价值。研究发现, 大多数植物矮化是由于突变体体内赤霉素 (gibberellin)^[1] 和油菜素类固醇 (brassinosteroid)^[2] 代谢受到影响, 而导致矮化的发生; 少数植物矮化的发生与生长素 (auxin) 有关^[3]; 此外, 还有一些是同源异型盒基因的异常表达所致^[4]。以前发现的多种 *dl* 水稻矮化突变体中的矮化基因被证实为编码 G 蛋白 α 亚基 (Rice G protein alpha-subunit, *RGA*), 对其机理的深入研究表明 *RGA* 可能与 GA 的信号转导有关^[5]。Ashikari 等^[6] 报道的 9 个水稻 *dl* 突变体 (FL2, HO532, HO533, HO537, HO538, HO541, HO552, CM392, CM1729) 和 Fujisawa 等^[5] 报道的 5 个 *dl* 突变体 (CM1361-1, DK22, DKT-1, DKT-2, ID-1) 都是 *RGA* 基因编码区发生了不同程度的变化, 致使 *RGA* 蛋白的一级或高级结构发生改变, 导致株型矮化。我们曾经利用 γ -Co⁶⁰ 诱变处理水稻品种特光矮-2 (TGA-2) 获得一株矮化突变体 *dwarf69*^[7]。在本研究中, 我们进一步对其遗传和分子生物学特性进行了研究, 初步证实 *dwarf69 RGA* 的编码区没有显著的改变, 而其 5' 上游区序列与其野生种不同; 并且发现 *RGA* 在 *dwarf69* 茎端分生组织中的表

达量显著减少, 这一差异可能是导致 *dwarf69* 植株矮化的原因。

1 材料与方法

1.1 植物材料及其诱变处理

供诱变处理的水稻籼稻品种特光矮-2 (*Oryza sativa* L. cv. TGA-2) 由广东省农科院水稻研究所王丰副研究员提供。用 γ -Co⁶⁰ 对 TGA-2 种子进行 60 Gy/min、辐射总量为 2.5 ~ 3.5 万 Gy 的辐射诱变。将 5 000 粒处理后的种子放在加水的培养皿中 37 °C 保温过夜, 第 2 天进行播种, 待长出 4 ~ 5 个叶片后移栽至大田。对株高显著矮于野生种的突变体进行自交培育至第 5 代, 命名为 *dwarf69*。分别测量野生种和突变体的株高、茎粗、穗长和第 11 叶的叶宽、叶长及叶绿素含量。将 *dwarf69* 与 TGA-2 进行杂交, 测量亲本和杂交后代 F₁、F₂、F₃ 成熟期的株高, 并进行数据统计与分析。

1.2 试剂

cDNA 合成试剂盒、pMD 18-T vector、连接酶购自 Takara 公司; Taq 酶、内切酶购自 Promega 公司。*E. coli* DH5 α 为本实验室保存。其它试剂均为 Sigma 公司和国产分析纯产品。

1.3 水稻总 DNA 和 RNA 的分离

水稻总 DNA 提取: 用常规的酚、氯仿/异戊醇

* 收稿日期: 2003-03-07

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项基金资助项目 (J00-A-009)

作者简介: 费小雯 (1973 年生), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 徐增富; E-mail: ls94@zsu.edu.cn

方法提取DNA^[7]。水稻总RNA提取:剥取 *dwarf69* 与 TGA-2 8 叶期茎端分生组织,利用异硫氰酸胍一步法提取总RNA^[8]。

1.4 水稻 RGA 全长 cDNA 的克隆

根据 GenBank 数据库中 Seo 等^[9]发表的水稻 RGA 全长 cDNA 序列(登录号: L28001)设计并合成 PCR 5'引物 RGAa: 5'-gggtaccatggctcatcctgtacaga-3' (下画线序列为加入的 *Kpn* I 位点)和 3'引物 RGAb: 5'-ggctagatcaagttccttcctggagcg-3' (下画线序列为加入的 *Xba* I 位点)。以 1 μ g 水稻茎端分生组织总 RNA 为模板,加入 0.5 μ g Oligo (dT)₁₈, 65 $^{\circ}$ C 变性 5 min,按 Takara cDNA 合成试剂盒提供的方法合成 cDNA 第一链。取第一链 cDNA 为模板,用 Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 480 进行 PCR 扩增。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,循环 30 个周期,最后一轮循环后在 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。按 Sambrook 等^[10]的方法以低熔点琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物。将 PCR 产物克隆进 pMD18-T 载体,用酶切鉴定得到阳性重组子后,进一步用双脱氧终止法测定 PCR 产物的 DNA 序列。

1.5 RGA 的表达分析

采用半定量 RT-PCR 法^[11],以水稻 *actin* 基因^[12]编码区的 356 bp PCR 片段作为内参。其中,引物 RGAa/b 浓度为 1 μ mol/L, *actin* 引物浓度为 0.05 μ mol/L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 1 min、50 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 2 min,扩增 35 个循环,72 延伸 7 min。

1.6 RGA 5'上游区序列的分析

根据 RGA 基因组序列 (GenBank 登录号: L35844),设计 6 个引物 (图 3 (a)):

- A 5'-ctgtgcatatgacccataggcag-3'
- B 5'-gaatga gatctgctacaggatgag-3'
- C 5'-ccatgggtcttgacagaagcagc-3'
- D 5'-ctgcctatgggtcatatgcacag-3'
- E 5'-cagtacgctattattcttgggtac-3'
- F 5'-ggatggattaggatgcgaatgcgg-3'

表 1 *dwarf69* 和 TGA-2 (各 30 株) 的株高、茎粗、穗长和第 11 叶的叶宽、叶长及叶绿素含量

Tab.1 The height, stem diameter, panicle length of TGA-2 and *dwarf69* plants, and the width, length and chlorophyll content of their 11th leaf.

项目	株高/cm	茎粗/cm	穗长/cm	叶宽/cm	叶长/cm	w (叶绿素) /10 ⁻³
<i>dwarf69</i>	44.8 $\pm$ 5.726	0.58 $\pm$ 0.061	13.76 $\pm$ 1.004	1.35 $\pm$ 0.226	8.8 $\pm$ 2.521	3.35 $\pm$ 0.037
TGA-2	92.4 $\pm$ 7.977	0.40 $\pm$ 0.058	26.38 $\pm$ 1.317	2.02 $\pm$ 0.203	36.2 $\pm$ 5.312	0.69 $\pm$ 0.031
<i>dwarf69</i> /TGA-2	0.48	1.18	0.52	0.67	0.24	4.86

1) 以干质量计

利用 5 对引物 A/B、C/D、E/F、C/F 和 E/D 通过 PCR 方法分别从 *dwarf69* 和 TGA-2 基因组 DNA 中扩增相应的片段。扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 加入 Taq 酶, 然后进行 30 个循环 (94 $^{\circ}$ C 1 min, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min) 的扩增, 最后一轮循环完成后, 样品继续在 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。其中, C/D 扩增产物的克隆和序列测定同前 (1.4)。

2 结果与讨论

2.1 突变体 *dwarf69* 与野生种 TGA-2 的表型分析

突变体 *dwarf69* 自交培育到 M5 代, 表型保持稳定^[7], 说明已得到稳定遗传的水稻矮秆突变株系。*dwarf69* 表型为矮化、茎秆粗硬、叶片直立、短而刚硬, 呈墨绿色, 分蘖较少, 育性较差, 种子粗短, 整体表现为生长受阻 (图 1)。表 1 统计了在大田生长条件下成熟期的 *dwarf69* 和 TGA-2 各 30 株的有关性状。可以看出 *dwarf69* 的株高和穗长均只有其野生种 TGA-2 的一半左右; 而对于最长的第 11 叶, *dwarf69* 的叶长为 TGA-2 的 1/4, 但 w (叶绿素) (以干质量计) *dwarf69* 是 TGA-2 的近 5 倍。



图 1 野生型水稻 TGA-2 (a)、矮化突变体 *dwarf69* (b) 及其杂交 (TGA-2 $\times$ *dwarf69*) F1 代 (c) 的表型

Fig.1 Phenotypes of wild type TGA-2 (a), dwarf mutant *dwarf69* (b) and their F1 progeny (TGA-2 $\times$ *dwarf69*)

dwarf69 与 TGA-2 的正反交试验结果表明: F1 代株高与 TGA-2 相近 (图 1, 表 2); 正反交的 F2 代群体出现株高性状分离现象 (表 2)。在正反交 F2 群体的 406 株个体中, 株高分布在 88~121 cm 的有 307 株, 平均为 109.30 cm; 株高分布在 23~62 cm 的有 99 株, 平均为 45.42 cm (表 2)。高矮两种表型接近 3:1 分离比, 说明 *dwarf69* 的矮秆突变表型可能涉及一对隐性等位基因。为了进一步验证结果, 从 F2 代中挑选出 3 株突变表型和 3 株野生表型植株的自交种子进行播种, 观察 F3 代表型。所有 3 株突变表型的植株 F3 代都表现为突变表型, 未出现性状分离, 为隐性纯合体; 而野生表型中有 2 株的后代出现性状分离, 为杂合体, 野生表型和突变表型的个体比例符合 3:1; 另一株的 F3 代全部为野生表型, 为显性纯合体, 这进一步说明 *dwarf69* 表型涉及一对隐性等位基因。

表 2 *dwarf69*、TGA-2 及其正反交
后代 F1、F2 的株高

Tab.2 The height of TGA-2, *dwarf69* and their F1 and F2 progeny plants of reciprocal crosses

项目	株高分布/cm	株数	平均株高/cm
TGA-2	86-101	30	92 ± 7.977
<i>dwarf69</i>	30-52	30	45 ± 5.726
TGA-2 × <i>dwarf69</i> F1	105-111	2	108 ± 1.414
<i>dwarf69</i> × TGA-2 F1	95-107	4	101 ± 2.062
TGA-2 × <i>dwarf69</i> F2	30-53	55	45 ± 5.223
	96-122	149	112 ± 4.753
<i>dwarf69</i> × TGA-2 F2	23-62	44	45 ± 4.135
	88-121	158	109 ± 5.880

2.2 *dwarf69* 和 TGA-2 *RGA* 基因编码区的克隆及其表达分析

鉴于以前发现的多种 *d1* 水稻矮化突变体都是由于 *RGA* 基因编码区发生了不同程度的变异而引起的^[5,6], 所以本研究用 RT-PCR 的方法分别从 *dwarf69* 和 TGA-2 中克隆了含完整编码区的 *RGA* cDNA。测序结果表明: 对于长度为 1 143 bp 的 *RGA* cDNA 读码框 (编码 380 个氨基酸), TGA-2 和 *dwarf69* 之间有一个核苷酸的差异 (A→G), 导致 *RGA* 的第 7 个氨基酸发生变异 (赖氨酸→精氨酸)。这一个核苷酸的差异有可能是 RT-PCR 过程中产生的, 也可能是诱变导致的。但我们认为该变异可能不会影响 *RGA* 基因在 *dwarf69* 中的表达及其蛋白质的结构和功能。这是因为另外两个已发表的水稻 *RGA* cDNA 序列^[9,13] 在相应位置都与 *dwarf69* 的序列相同。我们进一步采用半定量 RT-PCR 方法对 *RGA* 在 *dwarf69* 和 TGA-2 中的表达情况进行了比较分析。

从图 2 可以看到, 在 8 叶期的茎端分生组织中 *RGA* (实线箭头所示) 在 *dwarf69* 中的表达量显著低于其在 TGA-2 的表达量 (图 2 (a)), 而作为内参的 *actin* (虚线箭头所示) 的表达量在两者中相似。这一结果说明 *RGA* 在水稻矮化突变体 *dwarf69* 中不能正常表达。

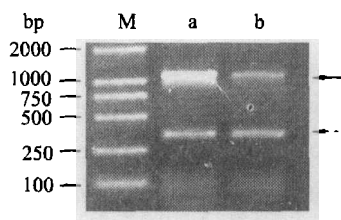


图 2 *dwarf69* 和 TGA-2 中 *RGA*
基因半定量 RT-PCR 表达分析

Fig.2 Semiquantitative RT-PCR analysis of *RGA*

gene expression of *dwarf69* and TGA-2

M: DNA 相对分子量质量标准;

a: 以 TGA-2 总 RNA 为模板;

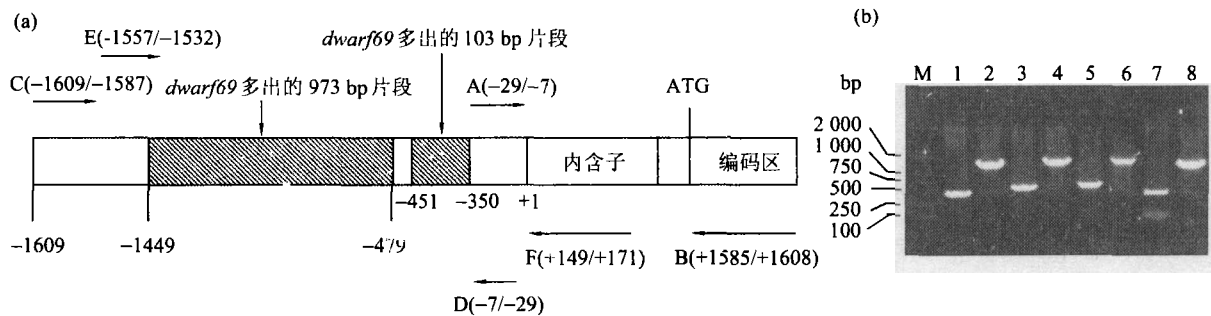
b: 以 *dwarf69* 总 RNA 为模板。

图中实线箭头为 *RGA* 的扩增产物,
虚线箭头为 *actin* 的扩增产物

2.3 *dwarf69* 和 TGA-2 中 *RGA* 基因 5' 上游区序列的克隆分析

尽管 *RGA* 基因的编码序列在水稻矮化突变体 *dwarf69* 中没有显著的变异, 仍可编码完整的蛋白质; 但在 *dwarf69* 中 *RGA* mRNA 的表达量大大低于其野生种 (图 2)。这很可能是由于 *RGA* 基因的调控序列发生变化而引起的。为此, 我们对突变体 *dwarf69* 和野生种 TGA-2 中的 *RGA* 基因 5' 上游区序列进行了比较分析。

根据 Seo 等 (1995)^[9] 发表的水稻 IR-36 的 *RGA* 基因组序列 (GenBank 登录号: L35844), 设计了 6 个 PCR 引物 (图 3 (a), 引物 A, B, C, D, E, F)。当用引物对 A/B, 分别以 *dwarf69* 和 TGA-2 基因组 DNA 为模板扩增 5' 上游区序列时, 结果都得到一个预期大小的约 1 650 bp 的 PCR 扩增片段 (资料未显示)。但用引物对 C/D 进行扩增时, 以 TGA-2 基因组 DNA 为模板, 扩增得到的是约 500 bp 的片段 (图 3, 泳道 1); 而以 *dwarf69* 基因组 DNA 为模板, 扩增得到的却是约 1 600 bp 的片段 (图 3, 泳道 2)。以突变体 *dwarf69* 基因组 DNA 为模板扩增出的片段比以野生种 TGA-2 基因组 DNA 为模板扩增出的片段长 1 100 bp, 这一结果出乎意料。为证实上述 PCR 扩增结果的可靠性, 用另外三对引物 E/F、C/F、E/D 分别进行扩增。结果是这 3 对引物与引物对 C/D 一样, 以突变体 *dwarf69* 基因组 DNA 为模板

图 3 TGA-2 和 *dwarf69* RGA 基因 5'上游区序列 PCR 分析Fig.3 PCR analysis of 5'upstream sequence of RGA gene from *dwarf69* and TGA-2

(a) 用于扩增 RGA 5'上游区序列的引物 A, B, C, D, E, F 的位置示意图, 序列编号根据 GenBank L35844^[9];

(b) TGA-2 和 *dwarf69* RGA 基因 5'上游区 PCR 扩增结果

M: DNA 相对分子质量标准;

1、3、5、7: 以 TGA-2 基因组 DNA 为模板, 分别以引物对 C/D、E/F、C/F、E/D 进行扩增;

2、4、6、8: 以 *dwarf69* 基因组 DNA 为模板, 分别以引物对 C/D、E/F、C/F、E/D 进行扩增

扩增出的片段都比以野生种 TGA-2 基因组 DNA 为模板扩增出的相应片段长 100 bp (图 3, 泳道 3-8)。这一结果说明 *dwarf69* 和 TGA-2 的 RGA 基因 5'上游区序列的长度确实存在着显著的差异。

为了更好地理解 *dwarf69* 和 TGA-2 的 RGA 基因 5'上游区序列的差异, 我们分别克隆了用 C/D 引物对扩增的两种产物 (分别为 1529 bp 和 453 bp)。测序结果显示: *dwarf69* 的 RGA 基因 5'上游区序列 (其 GenBank 登录号为 AY192152) 分别在 -1449/-479 和 -451/-350 两处 (序列编号根据 RGA1 的基因组序列 GenBank L35844^[9], 下同) 较 TGA-2 的 RGA 基因 5'上游区序列 (其 GenBank 登录号为 AY192153) 多出 973 bp 和 103 bp, 共计 1076 bp, 这一结果进一步证实了上述 PCR 分析的结果。

突变体 *dwarf69* 是采用辐射诱变获得的, 其 RGA 基因 5'上游区序列比其野生种 TGA-2 的 RGA 基因 5'上游区序列多出两个片段 (973 bp 和 103 bp), 有可能是插入突变而引起的。但令人费解的是在另外一个已发表的半矮秆水稻品种 IR-36 的 RGA 基因 5'上游区序列^[9]中也存在与第一个长插入片段几乎完全同源的片段 (-1449/-524)。虽然在 IR-36 的 RGA 基因 5'上游区找不到与第 2 个短插入片段同源的序列, 但在相应位置处有相同长度的非同源序列存在 (-451/-350)。另外, TGA-2 和 *dwarf69* 的 RGA 基因 5'上游区都缺少一个存在于 IR-36 中的 75 bp 的片段 (-221/-147), 这可能代表品种间的差异。

本研究是首次报道水稻矮化突变体中的 RGA 基因 5'上游区序列与其野生种的 RGA 基因 5'上游区序列存在显著的差异。但由于到目前为止,

GenBank 中只有一个水稻 RGA 基因 5'上游区序列 (L35844), 根据现有的资料我们还不能解释产生这种差异的原因, 以及这种差异与 RGA 基因的表达和突变体表型变异之间的关系。我们将进一步采用基因组步移的方法分别从 *dwarf69* 和 TGA-2 中克隆 RGA 基因 5'上游区序列, 同时分析比较更多其它水稻品种及其矮化突变体的 RGA 基因 5'上游区序列, 这将有助于理解其发生变异的原因。另一方面, 为了阐明 RGA 基因 5'上游区序列的变异与 RGA 基因的表达及突变体表型之间的关系, 我们将利用克隆自野生种 TGA-2 的 RGA 基因 5'上游区序列, 通过转基因方法研究能否使突变体 *dwarf69* 的 RGA 表达量恢复正常, 并使突变体回复为野生种表型。

参考文献:

- [1] ROSS J J, MURFET I C, REID J B. Gibberellin mutants [J]. *Physiol Plant*, 1997, 100: 550-560.
- [2] AZPIROZ R, WU Y, LOCASCIO J C, et al. An Arabidopsis brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 219-230.
- [3] YANG T, DAVIES P J, REID J B, et al. Genetic dissection of the relative roles of auxin and gibberellin in the regulation of stem elongation in intact light-grown peas [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110: 1029-1034.
- [4] SATO Y, SENTOKU N, MIURA Y, et al. Loss-of-function mutations in the rice homeobox gene OSH15 affect the architecture of internodes resulting in dwarf plants [J]. *EMBO J*, 1999, 18: 992-1002.
- [5] FUJISAWA Y, KATO T, OHKI S, et al. Suppression of the heterotrimeric G protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

- 1999, 96: 7575 – 7580.
- [6] ASHIKARI M, WU J, YANO M, et al. Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene *Dwarf 1* encodes the-subunit of GTP-binding protein[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 99: 10284 – 10289.
- [7] 王永胜, 王景, 李发强, 等. 水稻矮化突变体差异表达 cDNA 片段的克隆与分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2001, 40: 59 – 62.
- [8] 奥斯伯 F. 精编分子生物学指南[M]. 颜子颖. 等译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [9] SEO H S, KIM H Y, JEONG J Y, et al. Molecular cloning and characterization of *RGA1* encoding a G protein alpha subunit from rice (*Oryza sativa* L. IR-36)[J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 1119 – 1131.
- [10] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [11] YIGAL A, SIMCHA L Y, NADYA M, et al. Clausa, a tomato mutant with a wide range of phenotypic perturbations, displays a cell type-dependent expression of the homeobox gene *LeT6/TKn2* [J]. *Plant Physiology*, 2000, 124: 541 – 552.
- [12] REECE K S, MCELROY D, WU R. Genomic nucleotide sequence of four rice (*Oryza sativa*) actin genes[J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 14: 621 – 624.
- [13] ISHIKAWA A, TSUBOUCHI H, IWASAKE Y, ASAH T. Molecular cloning and characterization of a cDNA for the alpha subunit of a G protein from rice[J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 353 – 359.

Genetic Analysis and Molecular Characterization of the GTP Binding Protein Alpha-subunit Gene from Rice Dwarf Mutant *dwarf 69*

FEI Xiao-wen¹, DENG Xiao-dong², WANG Yong-sheng¹, LIU Liang-shi¹, XU Zeng-fu¹

(1. The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education,

Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Station Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops,

Chinese Agricultural Academy of Tropical Crops, Haikou 571101, China.

Abstract: A dwarf mutant *dwarf 69* was obtained from wildtype rice (*Oryza sativa* L. var. TGA-2, indica) by gamma-ray irradiation with a Co⁶⁰ source. *dwarf 69* exhibited typical dwarf phenotypes, e. g. short, dark green leaves and low fertility. Genetic analysis showed that these dwarf phenotypes were conferred by a recessive mutant allele. Although only one nucleotide difference was found between the coding sequences of GTP binding protein alpha-subunit (*RGA*) gene from *dwarf 69* and its wildtype TGA-2, the expression level of the *RGA* gene in *dwarf 69* was significantly higher than that in TGA-2. Further sequence analysis of the 5' upstream of the *RGA* genes from *dwarf 69* and TGA-2 revealed that two extra fragments, 973 bp and 103 bp respectively, were present in the 5' upstream of the *RGA* gene of *dwarf 69* but not in the *RGA* gene of TGA-2. These results indicated that the mutation of the 5' upstream of the *RGA* gene might affect *RGA* expression in rice and therefore result in the dwarf phenotypes.

Key words: *Oryza sativa*; dwarf mutant; G protein alpha-subunit; 5' upstream region