

金鱼草 *S* 位点选择性转座子标定体系的建立

薛勇彪

(中国科学院发育生物学研究所植物遗传学和发育生物学实验室, 北京 100080)

摘要: 栽培金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.) 中有许多分子生物学上研究得较为透彻的 DNA 转座子, 但是它们的 *S* 位点已经失去了功能 (*Sc*) 位点, 故而为自交亲和。为了利用这些转座子进行 *S* 位点选择性的转座子标定实验, 将一个来自栽培金鱼草花型基因 *Cyc* 的活跃转座子 *Tam*⁵ 通过遗传重组的方法引入到与自交不亲和金鱼草种间杂种 (*A. majus* × *hispanicum*) *S* 位点紧密连锁的位置。限制性酶切片长度多态性 (RFLP) 的分析证明该转座子距 *S* 位点约 3 cM (centiMorgan), 并且保持了较高的转位活性, 其配子切除频率高达 20%。同时, 还讨论了花型和自交不亲和性基因连锁的可能的生物学意义。所建立的 *S* 位点选择性的转座子标定体系为详细研究金鱼草 *S* 核酸酶基因及其不同结构域在自交不亲和反应中的作用提供了新的技术平台。

关键词: 转座子标定; *S* 位点; 金鱼草

中图分类号: Q754 文献标识码: A 文章编号: 0577-7496(2000)04-0408-08

Establishment of the Self-incompatibility (*S*) Locus-directed Transposon Tagging System in *Antirrhinum*

XUE Yong-Biao

(Laboratory of Plant Genetics and Developmental Biology, Institute of Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: In order to perform mutational studies on genes from the self-incompatibility (*S*) locus, an *S* locus-directed transposon tagging system was established in *Antirrhinum*. Cultivated lines of *Antirrhinum majus* contain many molecularly well-characterized transposons, but are self compatible due to the presence of a non-functional *S* locus (*Sc*). In this study, an active transposon (*Tam*⁵) from the *Cycloidea* (*Cyc*) locus controlling flower asymmetry in *A. majus* was introduced to a position tightly linked to the functional *S* locus from self incompatible interspecific hybrids (*A. majus* × *hispanicum*) through genetic recombination. RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis showed that the transposon is 3 cM (centiMorgan) away from the *S* locus and retains high transpositional activity with a geminal excision frequency of 20%. Possible implications of the linkage between the *S* locus and genes controlling floral phenotypes were discussed. An active transposon tightly linked to the *S* locus constructed here will facilitate the generation of insertional mutants of the *S* locus encoded genes and may lead to dissecting their precise roles during self-incompatible reactions.

Key words: transposon tagging; *S* locus; *Antirrhinum*

在许多雌雄同花的被子植物中, 自体花粉的受精常常受到一种称为自交不亲和性 (self-incompatibility, SI) 的种内生殖障碍的抑制^[1]。在大多数自交不亲和的植物中, SI 的遗传学比较简单, 受控于由复等位基因构成的单一位点, 称为 *S* 位点 (*S* locus)。目前已经从多种植物的 *S* 位点中分离获得了控制 SI 表达的基因^[2-4]。在以茄科、玄参科和蔷薇科为代表的配子体自交不亲和植物中, 迄今为止分离到的惟一 *S* 位点基因编码一类核酸酶, 称为 *S* 核酸酶

(*S* RNases)^[5]。已有的证据表明它们参与了花柱 SI 的表达, 但是与花粉 SI 的控制无关^[3,6,7]。

虽然对 *S* 位点编码的基因有了一定的了解, 但是直接突变 *S* 基因的研究却很少。早期通过放射性诱变的方法获得了一些影响 *S* 位点功能的突变体, 它们分别影响花柱或花粉 SI 表达, 提示 *S* 位点可能至少由两部分组成, 一部分控制花柱 SI, 另一部分与花粉 SI 的表达有关^[1]。近来, 由于 *S* 基因的获得, 为研究少数天然发生的 *S* 位点突变体提供了可

能。例如,通过分析一种秘鲁番茄的自交亲和(*Sc*)突变体发现 S 核酸酶活性部位的组氨酸发生了突变,丧失了核酸酶活性,表明其酶活性是自交不亲和反应所必需的^[8]。对日本梨花柱 *Sc* 突变体的研究发现 S 核酸酶基因发生了缺失,提示它确实参与了花柱 SI,而与花粉 SI 无关^[9]。最近,通过放射性诱变得到了数个花烟草(*Nicotiana glauca*)花粉自交亲和突变体,利用 S 核酸酶基因为探针发现其中大多数突变体携带有一个多余的 S 等位基因^[10]。因此,控制花粉 SI 的基因即花粉 S 基因不同于 S 核酸酶基因,与早期的 S 位点的遗传突变结果一致^[1]。

为了全面深入了解 S 位点的结构和功能,有必要建立一个能够定向突变其编码基因的实验体系。玄参科栽培金鱼草是研究植物发育的一种模式系统,主要是因为它含有分子生物学上研究得较为透彻的 DNA 转座子,为突变体及其基因分离提供了方便^[11-16]。自交不亲和金鱼草属配子体型,与茄科植物的类似。在前期工作中,我们分离到了 3 个 S 核酸酶基因^[17]。虽然发现它们与 S 位点连锁,而且其表达模式和序列多态性也与它们参与花柱 SI 表达的推测是一致的,但是,对它们如何在自交不亲和反应中发挥作用却不了解。无疑,金鱼草 S 核酸酶基因突变体的获得是这一方面研究的重要基础。DNA 转座子常常转位到连锁的位置^[18,19],因此,利用与目的基因连锁的转座子获得突变体的可能性也会加大。这种突变方法称为位点选择性的转座子突变,已在突变体的产生及其基因分离和功能研究中得到了应用^[20-22]。

早期的遗传分析表明金鱼草花型基因 *Cycloidea* (*Cyc*)与 S 位点连锁^[23]。最近,利用转座子标定技术分离获得了 *Cyc* 基因^[24]。已鉴定的引起该位点突变的转座子有数种,而且有些比较活跃^[24]。但是,这些转座子的宿主栽培金鱼草为自交亲和,其 S 位点已经失去了功能,因此不能用于研究 S 位点的功能。基于两个位点的连锁关系,可以通过遗传重组的途径将活跃的转座子引入 S 位点的连锁位置,从而建立一个金鱼草 S 位点选择性的转座子突变体系。为了达到这一目的,在本实验中,建立了一个金鱼草 S 位点选择性的转座子标定体系,为突变金鱼草的 S 位点编码基因提供了可能。

1 材料和方法

1.1 植物材料

金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)的种植采用标准

的温室条件^[12]。栽培金鱼草品系(H211¹、G112A³⁹和 N98)和自交不亲和的金鱼草种间杂种(*A. majus* × *hispanicum*)分离群体及其亲本分别来自 Luo 等^[24]和 Xue 等^[17]。通常用 3 μg 的基因组 DNA 进行酶切和杂交分析。

1.2 分子技术

金鱼草基因组 DNA 的提取和杂交以及常规 PCR 按以前描述的方法^[17]进行。*Cyc* 位点和 S 核酸酶基因的探针分别来自 Luo 等^[24]和 Xue 等^[17]。

反向 PCR(IPCR)按下述方法完成。用所需限制性内切酶(10 U, BRL)在 20 μL 反应体积中完全切割 2 μg 金鱼草 DNA (37 °C, 2 h)。10 μL 的基因组 DNA 酶切产物在 400 μL 含 T₄ DNA 连接酶(2.5 U, BRL)的反应体积中在 4 °C 进行过夜连接反应。另外 10 μL 基因组 DNA 酶切产物进行同样的反应,但是不加连接酶。连接和不连接产物分别经酚/氯仿抽提和酒精沉淀后都溶于 200 μL 的无菌水中。用其中的 10 μL 进行 PCR,扩增条件与常规 PCR^[17]一样,但退火温度为 55 °C。PCR 产物经 Wizard kit (Promega)纯化后克隆到 pGEM-T 载体(Promega)。利用 PCR 的方法从所获阳性质粒中扩增其插入片段,经 Promega 纯化后用于 DNA 测序分析(ABI370, PE)。用 GCG 软件包进行相关的 DNA 序列数据的处理和分析。

Tam5 转位后印迹序列的克隆采用基因组 PCR 的方法,所用引物为 Y4 和 Y77。利用 50 ng 基因组 DNA 进行 PCR,其扩增条件和 PCR 片段的克隆、测序及分析与上述相同。

1.3 引物序列

用于 IPCR 和转座子 *Tam5* 印迹克隆实验的引物序列为 Y4 (5'-TCGATCTAAAACTTGTGTC-3')、Y5 (5'-GGCATATTATTGAACCCGAGG-3')、Y73 (5'-CTGCCAACCCGGAATAAACTAGAAGC-3')、Y77 (5'-CAAACACAATGCGGGGCC-3')和 Y80 (5'-AAGT-TGTTTTCTTTTGTGCTC-3')。

2 实验结果

2.1 *Cyc* 位点和 S 位点的遗传距离约为 3 cM

早期的遗传实验证明控制花不对称性的 *Cyc* 基因与 S 位点有连锁关系^[23],但是没有两个位点精确遗传距离的估计。最近,通过转座子标定技术分离获得了 *Cyc* 基因^[24],发现它属于一类新的基因家族(TCP)^[25]。我们对金鱼草自交不亲和性的前期研究中建立了 4 个 S 等位基因(S₁、S₂、S₄和 S₅)分离的群体,并分离获得了 3 个 S 位点编码的核酸酶基因

(S_2 、 S_4 和 S_5)^[17]。这些进展为进一步确定两个位点的遗传距离提供了可能。利用 4.8 kb 的含全部 *Cyc* 基因编码区域的 *EcoR* I 片段为探针 (*Cycp1*) (参见图 2), 对多种酶切的金鱼草 *S* 等位基因分离群体的亲本进行了 DNA 印迹杂交分析, 结果表明该探针可以在 *EcoR* I 酶切的亲本 DNA 之间检测出能够区别 4 个等位基因的限制性酶切片段多态性 (RFLP) (图 1)。在亲本 S_2S_4 中, 与 *Cycp1* 杂交的两个片段分别代表 S_2 和 S_4 基因型, 其大小为 5.5 和 5.6 kb。虽然这两个片段非常接近, 但是在长时间电泳分离后可以观察到两者的差异 (数据未出示)。另外, *Cycp1* 与亲本 S_1S_5 的 DNA 杂交的两个片段分别代表 S_1 和 S_5 , 其大小为 6.1 和 6.8 kb, 容易将这两个基因型分开。通过对该分离群体中 30 株个体的 DNA 杂交分析, 发现 1 株材料——D285¹¹, *Cyc* 基因代表的 *S* 基因型 (S_1S_2) 与 *S* 核酸酶基因代表的基因型 (S_5S_2 , 参见 Xue 等^[17]) 不符 (图 1), 表明该植株为亲本 (S_1S_5) 中两个等位基因在 *S* 和 *Cyc* 位点之间发生了重组后产生的配子与 S_2 杂交后的结果, 其余 29 株中 *Cyc* 位点表现出的 *S* 等位基因的多态性与 *S* 核酸酶基因表现的相一致 (图 1)。这里显示的是代表 4 个不同分离组合的 8 个单株的杂交结果, 其余 22 个单株的杂交结果未出示。据此推算, *S* 位点与 *Cyc* 基因之间的遗传距离大约为 3 cM, 与早期的遗传实验结果吻合。这一结果为构建正常 *S* 位点和 *cyc* 突变体所携带的活跃转座子之间的重组子提供了分子遗传学的依据。

2.2 *cyc650* 含的转座子为 *Tam5*

从转座子突变实验获得了 5 个 *cyc* 突变体, 其中 *cyc650* 所携带的转座子较为活跃, 表现出高配子切除频率^[24], 但是对引起该突变的转座子类型却没

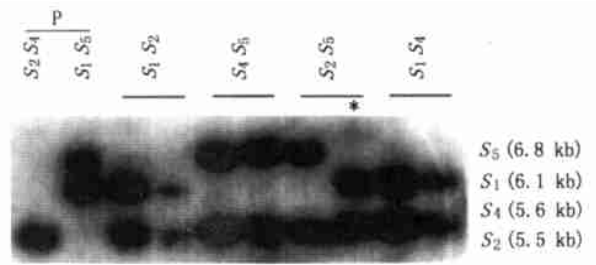


图 1. *Cyc* 与 *S* 位点的连锁分析。

Fig. 1. Linkage analysis of the *Cyc* and *S* loci.

Genomic DNA from the population segregating for 4 *S* alleles and the parental lines (P) were digested with *EcoR* I and probed with *Cycp1* (see Fig. 2). Eight individuals representing 4 types of *S* gene combinations and their parents were shown and their *S* genotypes are indicated on the top^[17]. The *S* genotypes inferred from *Cycp1* are indicated on the right and the lengths of the hybridizing fragments in the parenthesis. Lane marked by * represents D285¹¹, a recombinant between the *S* and *Cyc* loci.

有研究。为了更好地利用该转座子进行位点选择性的转座子突变, 我们采用 IPCR 技术对该转座子进行了分子生物学鉴定。

Cyc 位点的 DNA 序列和 *cyc650* 携带转座子的大致位置已经知道^[24]。为了分离转座子的右端序列, 设计了位于近 *Cyc* 基因 5'端 *EcoR* I 切点上游的两个引物 (Y5 和 Y73) 用于 IPCR 实验 (图 2)。早期的 DNA 印迹杂交实验证明 *cyc650* 转座子中含有一个 *EcoR* I 切点^[24], 而且位于 *Cyc* 基因上游的 1.1 kb 的 *EcoR* I 片段内 (图 2)。金鱼草 G112A³⁹ 和 H211¹ 系分别含杂合和纯合的 *cyc650* 等位基因, N98 为野生型 *Cyc* 的品系 (分别为图 3 的泳道 1 和 4、2 和 5 以及 3 和 6), 其 DNA 经过 *EcoR* I 酶切和连接后, 用 Y5 和 Y73 引物进行 PCR, 获得一条 1.55 kb 的片段, 根据转座子插入 1.1 kb *EcoR* I 片段的位置和相应的 *Cyc* 序列, 推算该片段含有 500 bp 的转座子序列。在野生型和杂合 *Cyc* 品系中都扩增出一条对应于正常的 *Cyc* 基因序列的 1.1 kb 片段^[24] (图 3A)。

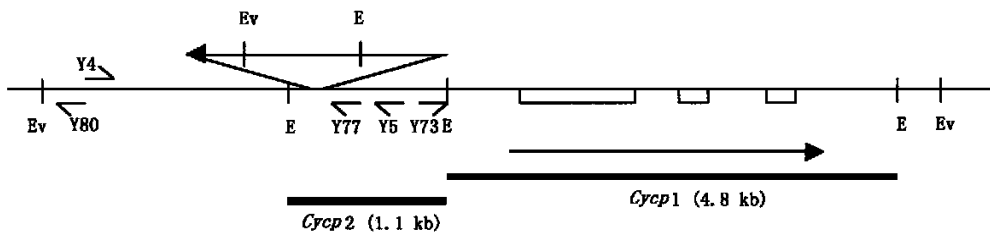


图 2. *cyc650* 位点示意图。

Fig. 2. A schematic map of *cyc650*.

Transcription directions, primer locations, transposon and exons are indicated by arrows, one-sided arrows, triangle and boxes, respectively. Two black lines show the probes used for DNA blot hybridization. E, *EcoR* I; Ev, *EcoR* V. The map is not drawn to scales.

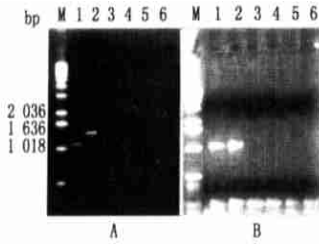


图 3. *cyc*⁶⁵⁰ 携带的转座子末端序列的克隆。

Fig. 3. Cloning of the transposon ends from *cyc*⁶⁵⁰.

A. 1.0% agarose gel analysis of the IPCR products representing the right end of the transposon using primers Y⁵ and Y⁷³. Lanes 1 and 4, 2 and 5 and 3 and 6 correspond to the lines G112A³⁹ (*Cyc/cyc*⁶⁵⁰), H211¹ (*cyc*^{650/cyc⁶⁵⁰) and N98 (*Cyc/Cyc*), respectively. The lengths of DNA markers are indicated on the left in base pairs. Lanes 1–3 are the IPCR products with the inclusion of T₄ DNA ligase and 4–6 without it. B. 1.0% agarose gel analysis of the IPCR products representing the left end of the transposon using primers Y⁴ and Y⁸⁰. The illustrations are the same as in A.}

为了分离转座子左端的序列,上述相关材料的 DNA 经 *EcoR* V 酶切和连接后,用 Y⁸⁰ 和 Y⁴ 引物进行 PCR,在纯合和杂合的突变体中获得了一条 1.11 kb 的扩增产物(图 3B),推算含有 0.5 kb 的转座子序列。但并没有获得代表野生型 *Cyc* 基因的扩增片段,这可能与野生型 *EcoR* V 片段大于 5 kb 有关^[24](图 2),常规的 PCR 一般不能有效地扩增这样大小的片段。另外,两类 IPCR 反应在没有加连接酶的情况下,都没有扩增出产物(图 3),说明 IPCR 扩增产物的特异性。

分别对含有转座子左右两端序列的 IPCR 产物进行克隆和测序后发现(数据未出示),它与已分离的 *Tam*⁵ 的序列相同^[15],表明 *cyc*⁶⁵⁰ 所含的转座子

为 *Tam*⁵。该转座子的长度为 5.3 kb^[16]。同时,这些实验也确定了 *Tam*⁵ 的转录方向与 *Cyc* 的相反(图 2;Dolye^[16])。

2.3 *Tam*⁵ 和功能正常的 *S* 等位基因之间重组子的构建

携带纯合 *cyc*⁶⁵⁰ 等位基因的栽培金鱼草系是自交亲和的,因为它的 *S* 位点的功能已经丧失(*Sc*)。为了将 *cyc*⁶⁵⁰ 携带的 *Tam*⁵ 与功能正常的 *S* 等位基因结合,我们进行了一系列的遗传杂交和分子遗传学实验。利用已获得的自交不亲和和种间杂种材料——T249¹⁷ (*S*₄*S*₅)和 D285²⁹ (*S*₂*S*₅)为父本^[16],纯系 *cyc*⁶⁵⁰ (N119² 和 N119¹⁰)为母本进行杂交,分别获得了两个 F₁ 家系——R250¹⁻¹² 和 R251¹⁻¹⁰(图 4)。它们为杂合 *cyc*⁶⁵⁰,花的表型为正常的两侧对称。为了选择合适基因型的 F₁ 植株进行杂交,分别对这两个家系的 *S* 和 *cyc*⁶⁵⁰ 的基因型进行了鉴定。以 *Cyc*p¹(图 2)为探针进行 DNA 印迹杂交确定了两个家系的 *S* 基因型(图 5A, 参见图 1),发现 4 种不同组合的基因型都存在。与用 *S* 核酸酶基因杂交的结果^[17]相同(数据未出示,但是可参见图 6)。为了确定 F₁ 植株中 *cyc*⁶⁵⁰ 的基因型,以 *Cyc* 上游的 *Cyc*p²(图 2)探针进行了杂交(图 5B),1.55 和 1.1 kb 的杂交片段分别代表 *cyc*⁶⁵⁰ 和野生型 *Cyc* 或 *Tam*⁵ 切除等位基因。这一结果表明近一半的植株具有预期的杂合基因型,但是其余植株中代表 *cyc*⁶⁵⁰ 的 1.55 kb 的 *EcoR* I 片段消失了,产生了其他的杂交片段,可能是 *Tam*⁵ 发生转位的结果。这一结果也表明 *Tam*⁵ 在 F₁ 代中保持了较高的转位活性。分

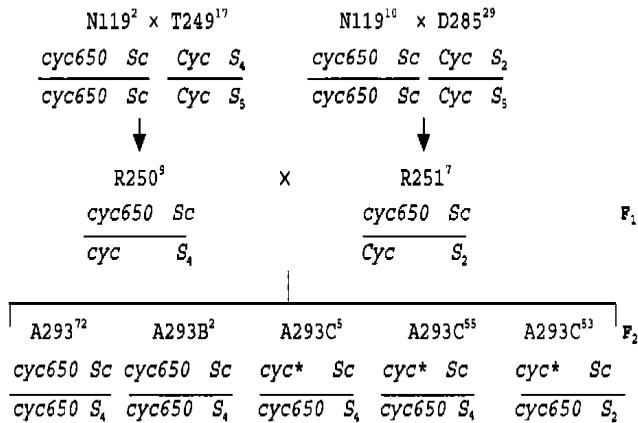


图 4. *cyc*⁶⁵⁰ 和 *S* 位点重组子获得谱系图。

Fig. 4. Scheme for generating recombinants between the *S* and *Cyc* loci.

N119² and N119¹⁰ are self-compatible and homozygous *cyc*⁶⁵⁰ lines of *Antirrhinum majus* and were used as male parents for crosses. The female parents, T249¹⁷ (*S*₂*S*₄) and D285²⁹ (*S*₂*S*₅), are self-incompatible interspecific *Antirrhinum* lines carrying homozygous *Cyc* alleles. Two F₁ plants, R250⁹ and R251⁷, were reciprocally crossed to produce the F₂ plants including 5 recombinants. *cyc** indicates the recessive allele caused by *Tam*⁵ excisions.

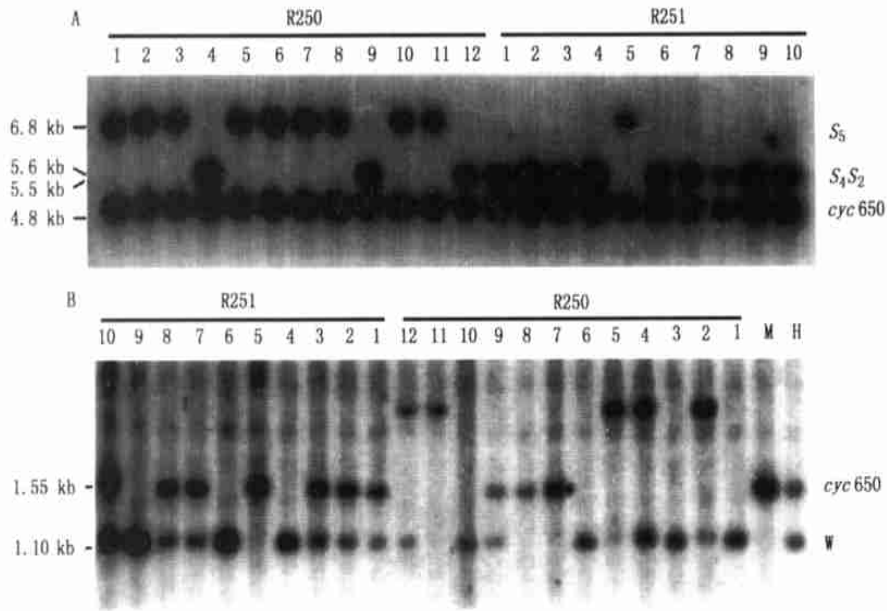


图 5. F₁ 代植株 S 和 *cyc*⁶⁵⁰ 基因型的鉴定。

Fig. 5. Identifications of S and *cyc*⁶⁵⁰ genotypes of the two F₁ families.

A. S genotype determination. Genomic DNA from the two F₁ families, R250¹⁻¹² and R251¹⁻¹⁰, were restricted with *EcoR* I and probed by *Cyep*1 (Fig. 2). The lengths of the hybridizing fragments are shown on the left and the S genotypes represented by them on the right. B. *cyc*⁶⁵⁰ genotype determination. Genomic DNA of 3 μg from the two F₁ families were cut with *EcoR* V and probed by *Cyep*2 (Fig. 2). W shows *Cyc* or *cyc** allele. The illustrations are the same as in A.

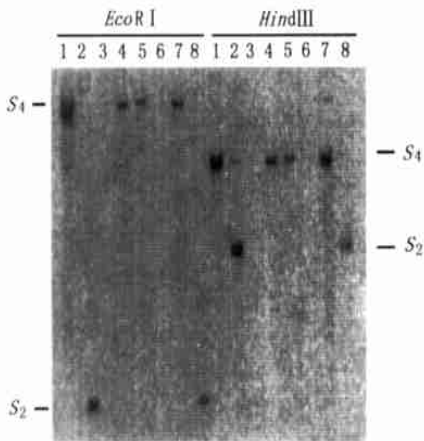


图 6. *cyc*⁶⁵⁰ 和 S 位点重组子的 S 基因型的确认。

Fig. 6. Confirmation of S genotypes of the recombinants between the S and *cyc*⁶⁵⁰ loci.

Genomic DNA from the lines were restricted with *EcoR* I or *Hind* III and probed by a mixture of S₂ and S₄ genes^[17]. Lanes 1-8 are R250⁹, R251⁷, A293², A293⁷², A293B², A293C¹, A293C⁵⁵ and A293C⁵³, respectively. A293² and A293C¹ are homozygous *cyc*⁶⁵⁰ lines without S RNase genes. For the genotypes of the rest lines refer to Fig. 2. A293C⁹ was not included in this analysis. The S genotypes represented by the hybridizing fragments are shown on both sides.

别从两个 F₁ 家系中选择了 1 个杂合 *cyc*⁶⁵⁰ 植株——R250⁹ (S₄Sc) 和 R251⁷ (S₂Sc) 进行杂交 (图 5), 总共获得了 600 个 F₂ 代植株。由于纯系 *cyc*⁶⁵⁰ 的花型为辐射对称花, 很容易与携带野生 *Cyc* 等位基因植株的两侧对称花区分开来, 为筛选 F₂ 代中纯和

的 *cyc*⁶⁵⁰ 位点提供了一个表型标记。通过花型的筛选从 600 株中得到了大约 150 个花型为辐射对称的植株, 表明它们可能含纯合 *cyc*⁶⁵⁰ 基因型。利用 S₂ 和 S₄ 核酸酶基因对这些植株进行了 DNA 印迹杂交, 从中发现了 5 个含相应的 S 核酸酶基因 (图 6), 其余植株的杂交结果未出示, 表明这 5 株为 *cyc*⁶⁵⁰ 和 S 位点的重组子, 其中 1 个含 S₂ (A293C⁵³), 4 个含 S₄ (A273⁷², A293B², A293C⁵ 和 A293C⁵⁵)。为了进一步确定这些重组子中 *cyc*⁶⁵⁰ 的基因型, 利用 *Cyep*2 对这些重组子的 DNA 做了印迹杂交, 结果表明 A273⁷² 和 A293B² 含有纯合 *cyc*⁶⁵⁰ 基因型, 而其余 3 个重组子为杂合 *cyc*⁶⁵⁰, 因为它们的花型仍为突变型, 说明所携带的 1.1 kb 的杂交带 (*cyc**) 与正常的不同, 可能为转座子转位后没有使得 *cyc* 基因的功能得以恢复 (图 7)。同时, 这一结果也进一步印证了 *Cyc* 与 S 位点遗传距离约为 3 cM 的推算。

2.4 重组子中的 *Tam*5 具有高的转座活性

为了证明 *Tam*5 在重组子中仍具有转座的活性, 我们对重组子的自交后代进行了分析。由于重组子含有 Sc 等位基因, 它们是自交亲和的。分别由重组子 A293B² 和 A293C⁵³ 自交后产生了两个家系 YX¹⁻¹⁵ 和 YX⁴⁻¹⁵。在 30 个自交后代中, 发现 6 个花型为两侧对称的恢复植株 (YX^{1-6,8} 和 YX⁴), 显示重组子中 *Tam*5 的配子切除频率高达 20%, 表明

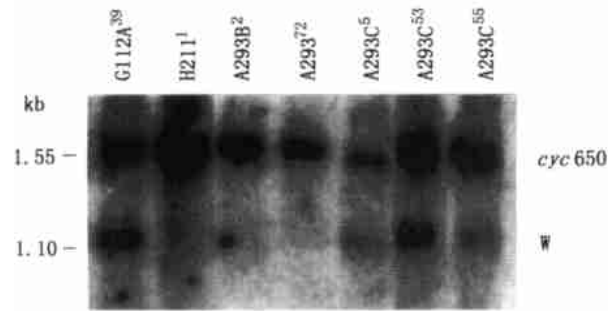


图 7. 重组子 *cyc650* 基因型的鉴定。

Fig. 7. Identification of *cyc650* genotypes of the recombinants. Genomic DNA from the parental lines and recombinants were restricted with *EcoRV* and probed by *Cycp2*. The lengths of and the genotypes represented by the hybridizing fragments are indicated on the left and right, respectively. W shows *Cyc* or *cyc*^{*} allele.

Tam5 在重组子中可以继续转位, 而且保持了较高的转位活性。为了证明这些恢复植株确实是 *Tam5* 转位的结果, 利用转座子两翼的一对引物 (Y4 和 Y77) (图 2) 对 6 个恢复植株中 *Tam5* 转位后所留下的印迹 (footprints) 进行了克隆和 DNA 序列分析, 发现每个印迹都与转座子转座后所留下的典型印迹相吻合^[15] (图 8), 说明 *S* 位点连锁的 *Tam5* 完全保持了其正常的转位功能。

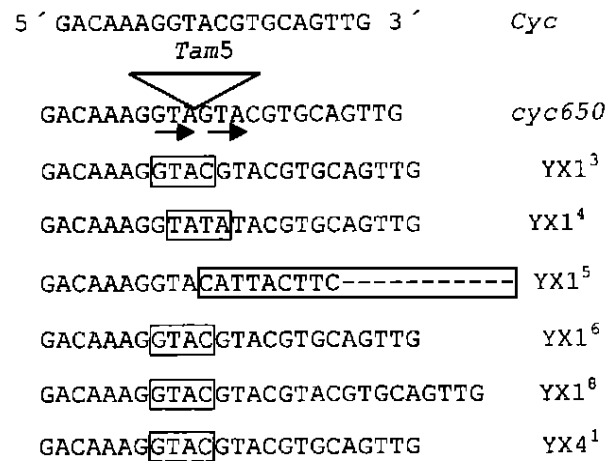


图 8. 重组子后代 *Tam5* 转位后的印迹分析。

Fig. 8. Footprints analysis of the recombinant progeny after *Tam5* transposition.

YX1^{3-6,8} and YX4¹ lines were from the recombinants A293B² and A293C⁵³, respectively. 3 bp target site duplications from *Tam5* insertion are indicated by arrows and the footprints produced after its excisions are boxed. The dotted line shows the sequence of unknown origin.

3 讨论

为了利用转座子研究 *S* 位点编码基因的功能, 本实验成功地将一个活跃的转座子 *Tam5* 引入与金

鱼草正常 *S* 位点紧密连锁的位置。首先, 通过 RFLP 分析的方法在分子遗传的水平上验证了花型控制基因 *Cyc* 和 *S* 位点的连锁关系, 并通过重组频率的计算确定了两个位点的遗传距离约 3 cM。第二, 通过一系列杂交、自交和相关的分子遗传学分析, 获得了 5 个 *Tam5* 和 *S*₂ 或 *S*₄ 等位基因连锁的重组子。第三, 对重组子中 *Tam5* 行为的研究表明该转座子具有较高的转位活性, 其配子切除的频率可达 20%。

3.1 *S* 和 *Cyc* 位点的连锁

对金鱼草自交不亲和性和花型控制基因的早期研究发现两者有连锁关系^[23], 子代分析表明两个位点之间可能有 20% 的重组率, 但是对它们之间的确切遗传距离没有实验证据。最近, 控制花型的 *Cyc* 和 *S* 位点编码的 *S* 核酸酶基因的分离^[17,24], 为精确计算两者的距离提供了可能。核酸酶基因本身具有很高的序列多态性^[17], 可以方便地用于基因型的鉴定。但是, *Cyc* 基因之间的多态性应该是比较少的。以栽培金鱼草的 *Cyc* 基因为探针, 检测到了来自 *A. hispanicum* 的 4 个不同 *S* 等位基因相关的 *Cyc* 位点的多态性, 可以清楚地将它们分辨开来 (图 1)。 *A. hispanicum* 中 *Cyc* 多态性的产生可能与自交不亲和位点的存在有关, 由于 *S* 等位基因之间的重组受抑制, 可能也会影响到与其紧密连锁的位点, 使后者的重组也相应地减少, 造成 DNA 序列多态性的增多。另外, 茄科的 *S* 位点位于着丝粒附近^[26], 这些区域多为异染色质, 相应的同源重组会受到抑制。有可能金鱼草的 *S* 位点也处于类似的位置, 因此位于异染色质区的 *Cyc* 基因发生重组的机会也相应减少, 造成 DNA 序列多态性的积累。当然这两种抑制同源重组的机制并不互相矛盾, 可能同时发挥作用。

S 和 *Cyc* 位点的紧密连锁是否有一定的生物学意义? 自交不亲和性作为一种种内生生殖障碍在花的早期进化中起了重要的作用^[1]。金鱼草为异花受粉植物, 两侧对称的花适应于虫媒传粉。 *Cyc* 位点的突变使在进化上较为高级的两侧对称花变为辐射对称花, 直接影响虫媒传粉。表明花的形态和自交不亲和性有密切关系的第二例子为异型自交不亲和性。在报春花属植物中, *S* 位点与控制雌雄蕊高度的基因位于同一位点, 组成了一个所谓的“超基因” (supergene)^[1]。因此看来, 花形态发育有关的基因与 *S* 位点在遗传上的紧密连锁可能与保证和维持一些显花植物实现异花授粉有一定的关系。

3.2 *S* 位点连锁转座子的特性和行为

金鱼草转座子已成功地用于多种基因的分

离^[11-16, 22, 24],但是,这些基因的分离都是在没有功能型 *S* 位点(*Sc*)的自交亲和栽培金鱼草中完成的。从自交不亲和的金鱼草品种中还没有分离到活跃的转座子。因此,用栽培金鱼草无法通过转座子研究 *S* 位点的结构和功能。我们曾通过种间杂交的实验将来自 *A. hispanicum* 的正常 *S* 等位基因引入栽培金鱼草品系中^[17],并尝试了转座子诱变实验,获得了数个自交亲和的突变体,但是目前它们与转座子的关系还不明了(Y. Xue 等,待发表结果)。

本文通过杂交和自交等方法把 *Tam5* 引入到 *S* 位点连锁的位置(图 4),为了确保所用杂交植株正确的基因型,我们利用 *Cyc* 位点的探针进行了 DNA 印迹杂交分析证明所选用的两株 *F*₁ 植株 R250⁹ (*S*₁*Sc*)和 R251⁷ (*S*₂*Sc*)具有期望的基因型(图 5)。通过筛选它们杂交的 600 个 *F*₂ 后代,共得到 150 株突变花型的 *F*₂ 植株,从中获得了 5 株 *Tam5* 和 *S* 基因的重组子(图 6)。为了保证重组子仍含有纯合的 *Tam5*,对它们做了进一步的分析,发现其中 2 株(A293⁷²和 A293B²)含有纯合的 *Tam5*,另外 3 株(A293C⁵、A293C⁵³和 A293C⁵⁵)在该位点表现出杂合性(图 7)。按理说,如果这 3 株在 *Cyc* 位点表现出杂合性,其表型应为野生型,但是它们却表现突变型。这可能与 *Tam5* 转位后常常造成的影响,如缺失、重组等有关,因此在这 3 株中 DNA 杂交显示的 *Cyc* 基因型为一种突变的基因(*cyc*^{*})。但是,我们并不知道发生 *Tam5* 转位的是正常 *S* 还是 *Sc* 染色体。由于转座子连锁转位的特性,可能发生转位的 *Tam5* 仍在同一条染色体上。这需要进一步的遗传和分子遗传分析证明。另外,对其中一个 *Tam5* 杂合重组子(A293C⁵³)子代的分析表明剩余的 *Tam5* 转座子可以发生正常的转位(图 8)。

维持目的基因连锁转座子活性是进行位点选择性突变实验的基础。因此,我们对两个重组子后代中 *Tam5* 的行为做了研究,发现它保持了较高的配子体切除频率(20%),而且 *Tam5* 转位后的印迹也比较典型^[16](图 8)。虽然,高配子体切除频率可能有利于突变体的获得,但是对突变体的保持也提出了问题,因为所获得的突变体由于高配子体切除频率,很容易产生恢复突变。幸运的是, *Tam5* 转位后经常留下 4 个碱基的印迹(图 8),如果插入在基因的编码区,即使它转位后也可能产生移码突变,造成基因功能的减弱或丧失。

3.3 建立 *S* 位点选择性转座子标定的意义

目前已从多种植物中分离获得了多种 *S* 位点

编码的基因,表明 *S* 位点可能是一个相当复杂的位点^[2-4]。但是,对其中许多基因在自交不亲和反应中的确切功能了解不多。现在,一般采用反义或正义(共抑制)转基因的手段研究 *S* 位点编码基因的功能,取得了一些重要的结果^[27-32]。但是,大多数 *S* 位点编码的基因都属于多基因家族。由于同源性的存在,以转基因为基础研究 *S* 基因功能的方法往往不是很有效,因为转基因可能会影响到与目的基因同源基因的表达,造成实验结果解释的困难。所以,建立 *S* 位点转座子突变系统将大大帮助和改善这方面的研究。最近,通过转基因的方法将玉米的 *Ac* 引入到了与矮牵牛 *S* 位点连锁的位置^[26],但是这些转座子的活性在异源宿主中比较低,可能会影响到它们的进一步利用。

虽然已从金鱼草的 *S* 位点中分离到了编码的 *S* 核酸酶基因^[17],但是对于它在自交不亲和反应中发挥的详细作用,特别是该基因不同结构域在其中的功能了解不多。本实验建立的 *S* 位点选择性转座子标记体系可用于突变 *S* 核酸酶基因及其不同结构域,探明在它们体内作用的机制。另外,现有的遗传和分子遗传证据表明控制花粉自交不亲和和特异性的基因(花粉 *S* 基因)不同于 *S* 核酸酶基因,但是还没有分离获得花粉 *S* 基因^[2-4,7]。由于 *S* 核酸酶基因和花粉 *S* 基因位于同一位点^[1],转座子插入 *S* 核酸酶基因的材料将可以进一步用于突变花粉 *S* 基因的研究,提供分离该基因的一条途径。以金鱼草 *S* 位点选择性的转座子标定系统为基础,我们可以结合 PCR 技术利用基因和转座子特异的引物从比较大的突变群体中筛选 *Tam5* 插入 *S* 核酸酶基因的事件^[21,33],这样可大大提高突变筛选的灵敏度,达到研究 *S* 核酸酶在自交不亲和反应中的详细作用机制和逐步分离花粉 *S* 基因的目的。

致谢: 感谢英国 John Innes 中心的 E. S. Coen 教授和 R. Carpenter 博士对本项目的鼎力和慷慨支持以及阎先喜博士和崔海洋对本文提出的宝贵意见。

参考文献:

- [1] de Nettancourt D. Incompatibility in Angiosperms. Berlin: Springer-Verlag, 1977.
- [2] de Nettancourt D. Incompatibility in angiosperms. *Sex Plant Reprod*, 1997, **10**: 185-199.
- [3] Ren D-L (任东路), Zhang Y-S (张燕生), Xu Y-B (薛勇彪). Molecular basis of self-incompatibility. *Adv Plant Sci* (植物科学进展), 1998, **1**: 95-106. (in Chinese)

- [4] McCubbin A G, Kao T H. The emerging complexity of self-incompatibility (S-) loci. *Sex Plant Reprod*, 1999, **12**: 1—5.
- [5] McClure B A, Haring V, Ebert P R, Anderson M A, Simpson R J, Sakiyama F, Clarke A E. Style self-incompatibility products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature*, 1989, **342**: 955—957.
- [6] Dodds P N, Clarke A E, Newbiggin E. A molecular perspective on pollination in flowering plants. *Cell*, 1996, **85**: 141—144.
- [7] Xue Y-B (薛勇彪). Molecular basis of self and non-self pollen recognition in flowering plants. *Bull Natl Nat Sci Found China* (中国科学基金), 1999, **13**: 157—160. (in Chinese)
- [8] Royo J, Kurz C, Kowiyama Y, Anderson M, Clarke A E. Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 6511—6514.
- [9] Sassa H, Hirano H, Nishio T, Koba T. Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of S-RNase gene in Japanese pear (*Pyrus serotina*). *Plant J*, 1997, **12**: 223—237.
- [10] Golz J F, Su V, Clarke A E, Newbiggin E. A molecular description of mutations affecting the pollen component of *Nicotiana glauca* S locus. *Genetics*, 1999, **152**: 1123—1135.
- [11] Martin C R, Carpenter R, Sommer H, Saedler H, Coen E S. Molecular analysis of instability in flower pigmentation of *Antirrhinum majus*, following the isolation of the *pallida* locus by transposon tagging. *EMBO J*, 1985, **4**: 1625—1630.
- [12] Carpenter R, Martin C, Coen E S. Comparison of genetic behaviour of the transposable element Tam³ at two unlinked pigment loci in *Antirrhinum majus*. *Mol Gen Genet*, 1987, **207**: 82—89.
- [13] Carpenter R, Coen E S. Floral homeotic mutations produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Genes Dev*, 1990, **4**: 1483—1493.
- [14] Coen E S, Romero J M, Doyle S, Elliot R, Murphy G, Carpenter R. Floricaula: A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell*, 1990, **63**: 1311—1322.
- [15] Luo D, Coen E S, Doyle S, Carpenter R. Pigmentation mutants produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Plant J*, 1991, **1**: 59—69.
- [16] Doyle S. Transposable elements inserted at the *Incolorata* locus of *Antirrhinum majus*. Norwich: M. Phil. Thesis, University of East Anglia (UK), 1996.
- [17] Xue Y, Carpenter R, Dickinson H G, Coen E S. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* S locus RNases. *Plant Cell*, 1996, **8**: 805—814.
- [18] Greenblatt I M. A chromosome replication pattern deduced from pericarp phenotypes resulting from movements of the transposable element, *modulator*, in maize. *Genetics*, 1984, **108**: 471—485.
- [19] Jones J D G, Carland F, Maliga P, Dooner H K. Preferential transposition of the maize element *Activator* to linked chromosomal locations in tobacco. *Plant Cell*, 1990, **2**: 701—707.
- [20] Jones D A, Thomas C M, Hammond-Kosack K E, Balint-Kurti P J, Jones J D G. Isolation of the tomato *Cf⁹* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, 1994, **266**: 789—793.
- [21] Das L, Martiensson R. Site-selected mutagenesis at the *hfc106* locus in maize. *Plant Cell*, 1996, **7**: 287—294.
- [22] Bradley D, Carpenter R, Copsey L, Vicent C, Rothstein S, Coen E. Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature*, 1996, **379**: 791—797.
- [23] Brieger F G. The inheritance of self-sterility and the peloric flower shape in *Antirrhinum*. *Genetica*, 1935, **17**: 385—408.
- [24] Luo D, Caepenter R, Vincent C, Copsey L, Coen E. Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature*, 1996, **383**: 794—799.
- [25] Cubas P, Lauter N, Doebley J, Coen E. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J*, 1999, **18**: 215—222.
- [26] Hoopen R T, Harbord R M, Maes T, Nanninga N, Robbins T P. The self-incompatibility (S) locus in *Petunia hybrida* is located on chromosome III in a region syntenic for the Solanaceae. *Plant J*, 1998, **16**: 729—734.
- [27] Lee H S, Huang S, Kao T H. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature*, 1994, **367**: 560.
- [28] Mufett J, Antherton T, Mou B, Gasser C, McClure B A. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature*, 1994, **367**: 563—566.
- [29] Mufett J, Strabala T J, Zurek D M, Mou B, Beecher B, McClure B. S-RNase and interspecific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: multiple pollen rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self-incompatible and self-compatible species. *Plant Cell*, 1996, **8**: 943—958.
- [30] McCubbin A G, Kao T H. A mutant S³ RNase of *Petunia inflata* lacking RNase activity has an S-allele specific dominant negative effect on self-incompatibility interactions. *Plant Cell*, 1997, **9**: 85—95.
- [31] Matton D P, Maes O, Laublun G, Xike Q, Bertrand C, Morse D, Cappadocia D. Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *Plant Cell*, 1997, **9**: 1757—1766.
- [32] Zurek D, Mou B, Beecher B, McClure B. Exchanging sequence domains between S-RNases from *Nicotiana glauca* disrupts pollen recognition. *Plant J*, 1997, **11**: 797—808.
- [33] Koes R, Souer E, Van Houwelingen A, Mur L, Spelt C, Quattrocchio F, Wing J, Oppedijk B, Ahmed S, Maes T, Gerats T, Hoogeveen P, Meesters M, Kloos D, Mol J N M. Targeted gene inactivation in petunia by PCR-based selection of transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 8149—8153.