

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

利用阿拉伯芥 T-DNA Knockout 突變株，研究調控葉部形態發育之功能性基因(2/3)

計畫類別： 個別型計畫

計畫編號： NSC92-2311-B-002-025-

執行期間： 92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

執行單位： 國立臺灣大學植物科學研究所

計畫主持人： 靳宗洛

報告類型： 精簡報告

報告附件： 出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式： 本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 18 日

crl1-1D 與 *crl1-2D* 結果報告

一、中文摘要

藉由 pPZP202:BAR:SK 此全新、高便利性及高效率的 T-DNA tagging 載體，我們篩選出許多葉部形態在 T₁ 代就與野生型有差異的阿拉伯芥突變株。在此，我們針對二株性狀類似的葉型突變株進行研究，分別命名為 *creased leaf 1-1Dominant* (*crl1-1D*) 及 *creased leaf 1-2D* (*crl1-2D*)，它們的葉片具有皺縮、由外向內反捲且較為細長等突變性狀。此外，它們的生育力也較低，同時在它們自交子代中會出現只長出第一對真葉後即停止其他真葉發育的變異株。由 Southern blot 分析得知這二個突變株各有二個 T-DNA 嵌入，而嵌入位置並不完全相同，顯示這兩個突變株是各自獨立的，利用 Inverse PCR (IPCR) 找出其中一個 T-DNA 嵌入位置，發現二個突變株各有一個 T-DNA 嵌入 At2g36310 基因的下游，而且僅相差 307 bp，此基因暫先命名為 *CRL1*。經序列分析推測 *CRL1* 可能是一個次黃苷/尿嘧啶核苷水解酶，由 Northern blot 分析顯示在 *crl1-1D* 和 *crl1-2D* 突變株中 *CRL1* 基因的表現量均高於野生型。因此，在野生型中大量表現 *CRL1* 基因，結果在部份 35S::*CRL1* 轉植株中發現有長出第一對真葉後即停止其他真葉發育的轉植株，這與阿拉伯芥 *wuschel* (*wus*) 突變株類似，但是並沒有重現葉片皺縮的性狀。而葉部發育被抑制的轉植株中 *WUS* 基因並沒有表現。因此我們推測 *crl1-1D* 和 *crl1-2D* 變異株的葉片皺縮型態也許和 *CRL1* 並沒有直接關聯，但它的表現量可能對植物頂端分生組織的活性有影響，使葉片發育異常，但和葉部型態可能沒有直接的關聯。

關鍵詞：葉部形態、T-DNA 突變株、基因釣取、*creasd leaf1-1D*、*creasd leaf1-2D*
Abstract

By means of a de novo T-DNA tagging vector pPZP202:BAR:SK with high convenience and efficiency, we have screened many *Arabidopsis* T₁ T-DNA knockout lines, whose leaf morphology differs obviously from that in wild-type plant. In this report, we have identified two gain-of-function mutants, which were selected in the T₁ generation, *crl1-1D* (*creased leaf 1-1 Dominant*) and *crl1-2D* with a wrinkled curling inward and narrow leaf phenotype. In addition, the fertility was lower than wild type and some of the self-crossed progenies ceased to develop further after the first two leaves were initiated. Using Southern blotting analysis, two T-DNA insertions with different Southern patterns were detected in each line, indicating that *crl1-1D* and *crl1-2D* were independent T-DNA tagging lines. Inverse PCR (IPCR) identified that one of the T-DNA insertion sites in each mutant. Noteworthily, the T-DNA insertion site both are located at the down-stream region of At2g36310 (*CRL1*), and is distanced from each other by 307 bp, which encodes a putative inosine-uridine nucleoside hydrolase (IUNH). Northern blotting analysis using *CRL1* coding region

as a probe shown that the transcript levels were higher in mutants than that in wild type. To recapitulate phenotype of the *crl1-1D* and *crl1-2D* in wild type, transgenic plants with *CRL1* overexpression were generated. However, no transgenic plant with wrinkled leaf was observed, instead some 35S::*CRL1* seedlings showed phenotype similar to the loss-of-function mutant *wuschel* (*wus*). The *WUS* transcripts were not detected by RT-PCR analysis in 35S::*CRL1* lines with the *wus* phenotype, instead a shoot apical meristem (SAM) growth suppression was found. From these results, we suggest that overexpression of the *CRL1* might affect the SAM activity rather than leaf morphology.

二、緣由與目的

植物葉片的發生 (leaf ontogeny) 是由一連串重要且複雜的機制所調控，所以有許許多多的基因參與其中，因此，分離及鑑定只與葉片發育相關的基因是件不容易的事，其原因有二：首先是動物系統中並沒有類似基因；其次，大部分只存在於葉片的基因產物通常和光和作用或氣體交換有關。因此，本計畫的另一目的為利用製造突變株的方式來鑑定並分離調控葉片發育的重要基因，並進一步研究此類基因的生理特性及功能。

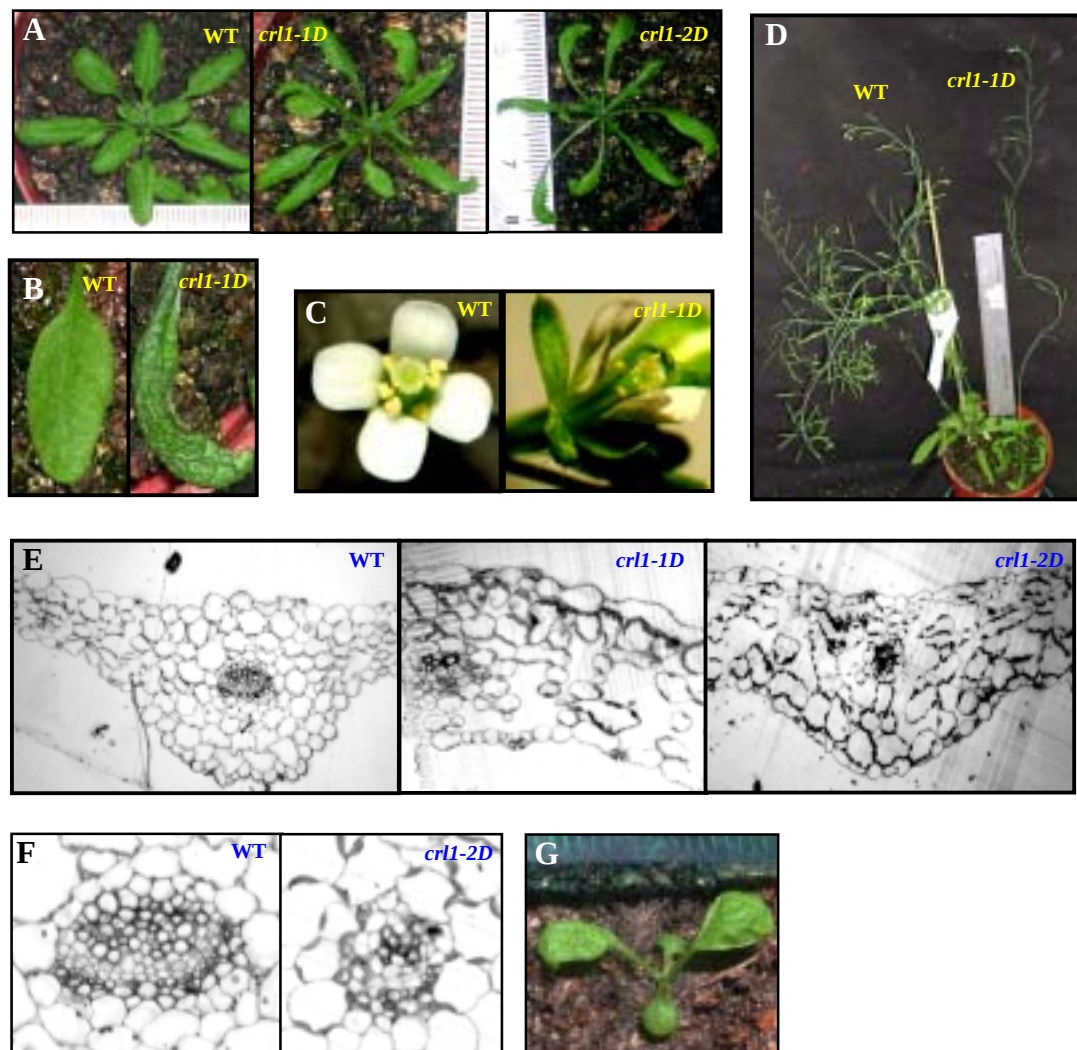
有關功能性基因的研究方式主要可分為二種：正向遺傳法 (forward genetics) 與反向遺傳法 (reverse genetics) (Krysan et al., 1999)。正向遺傳法是針對已知性狀改變的突變株，找出影響其性狀的基因為何，也就是從突變株來找出功能性基因 (from phenotype to gene)，所利用的方式多是利用前述所提到的方法來產生突變株再進行功能性基因分析。反向遺傳法則是已知發生改變的基因序列為何，而去觀察該基因的變異會造成何種性狀，也就是自基因來研究性狀 (from gene back to phenotype)，通常會將基因產生變異，如刪除特定區域或是將其異位表現來觀察對生物體性狀的改變。在這裡我們是以正向遺傳法的方式，首先利用 T-DNA tagging 獲得葉部型態有明顯變異的阿拉伯芥突變株 *crl1-1D* 和 *crl1-2D*，利用 IPCR 進行基因釣取後發現二者均各有一個 T-DNA 插入點位於 At2g36310 (*CRL1*) 基因的下游處。

三、結果與討論

3.1 *creasd leaf1-1D* (*crl1-1D*) 和 *crl1-2D* 性狀之觀察

- (1) 葉片細長會由外向內捲曲 (圖一 A) 且葉部表面有皺縮 (圖一 B)。
- (2) 花器雖會正常發育，但排列不如野生型規則 (圖一 C)。
- (3) 幾乎沒有次生花序，顯示突變株有明顯的頂芽優勢，且突變株果莢 (silique) 數目比野生型少且短 (圖一 D)。
- (4) 由葉的切片得知，*crl1-1D* 和 *crl1-2D* 的葉片較薄，其表皮細胞排列也較不規則 (圖一 E)，此外突變株的維管束比野生型小，排列也較野生型鬆散不整齊 (圖一 F)。

- (5) 二者自交後的子帶均會產生一種同樣具有葉部皺縮性狀，且長出第一對真葉後其他真葉即停止發育，具有生長點被抑制的植株（圖一 G）。



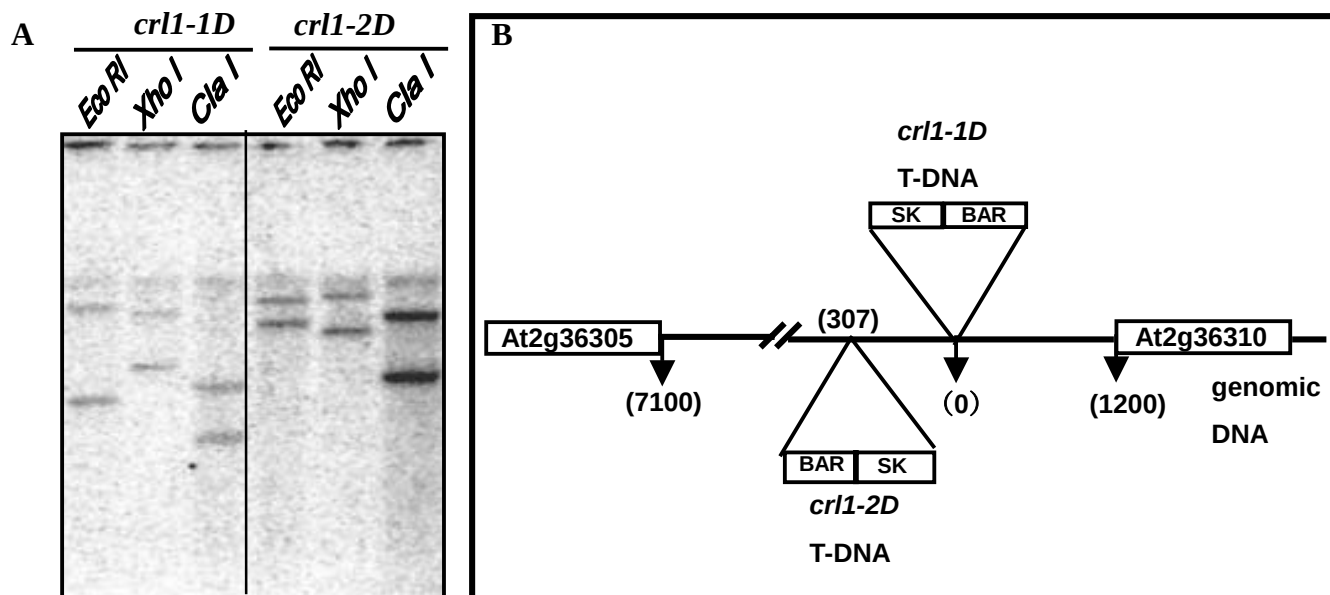
圖一 *crl1-1D* 與 *crl1-2D* 突變株與野生型植株性狀之比較。

- (A) 野生型（圖左）、*crl1-1D* 突變株（圖中）與 *crl1-2D*（圖右）
 (B) 野生型（圖左）與 *crl1-1D* 突變株（圖右）的葉部型態。
 (C) 野生型與（圖左）*crl1-1D* 的花部型態（圖右）。
 (D) 40 天大之野生型（圖左）與 *crl1-1D*（圖右）的成株。
 (E) 野生型（圖左）與 *crl1-1D*（圖中）、*crl1-2D*（圖右）葉的橫切面。
 (F) 野生型（圖左）與 *crl1-2D*（圖右）的葉片維管束橫切面。

3.2 T-DNA 插入數目分析及基因鈎取

藉由Southern blotting分析得知*crl1-1D*與*crl1-2D*突變株中有兩個T-DNA插於其基因組內（圖二A），此外，由於 *crl1-1D* 和 *crl1-2D* 雜合訊號的位置並不相同，顯示 *crl1-1D* 和 *crl1-2D* 這二個性狀相似的植株是各自獨立的突變。以

plasmid rescue及IPCR等基因鈎取的技術得到兩個T-DNA插入點周圍之植物DNA序列，並分別送定序及比對後，這二個突變株中各有一個T-DNA嵌入基因At2g36305和At2g36310間的區域，*crl1-1D* 的T-DNA位於At2g36310基因下游約1.2 kb，而*crl1-2D*的T-DNA位於At2g36310基因下游約1.5 kb，彼此只相差307 bp（圖二B）。



圖二 *crl1-1D* 與 *crl1-2D* 突變株中 T-DNA 數目以及插入之位置。

- (A) Southern blotting 分析之結果。*crl1-1D* 與 *crl1-2D* DNA 經不同限制酶切割，以 T-DNA 上之 BAR 基因做為探針行雜合反應，皆可偵測到兩個訊號。
- (B) *crl1-1D* 與 *crl1-2D* 突變株 T-DNA 插入模式圖。括號中的數字代表與 *crl1-1D* T-DNA 嵌入點的距離。

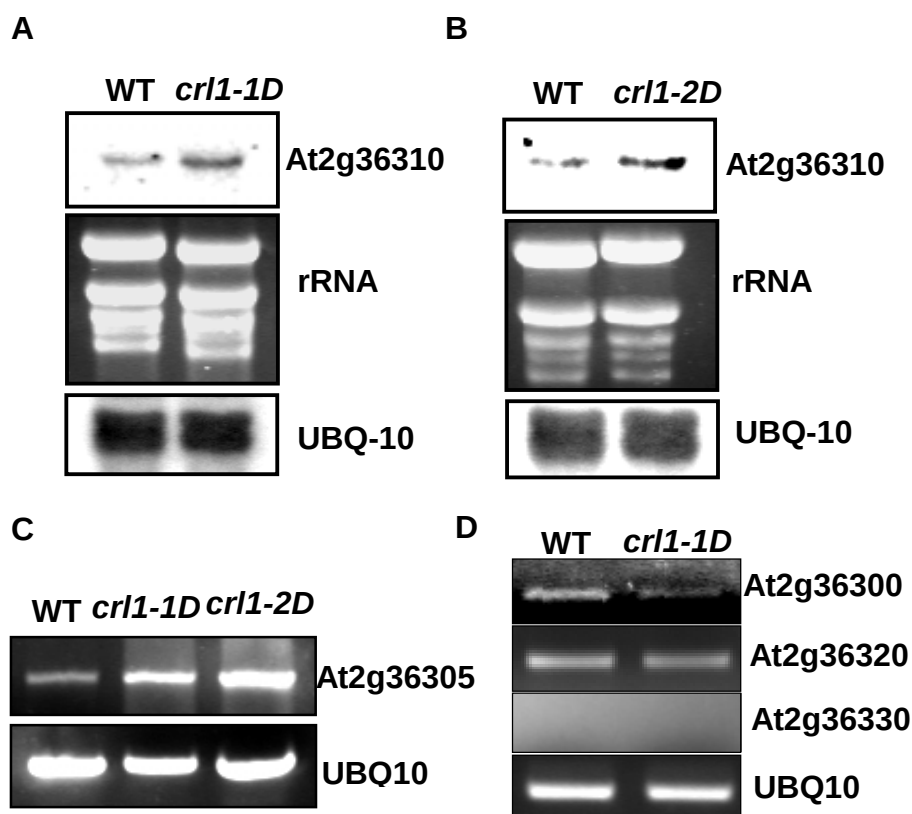
3.3 基因表現分析

有鑒於 *crl1-1D* 與 *crl1-2D* 突變株中各有一個 T-DNA 嵌入位置極近，因此藉由 Northern blotting 與 RT-PCR 分別進行該嵌入點鄰近基因在 *crl1-1D* 與 *crl1-2D* 中的表現分析，在 Northern blotting 中發現 At2g36310 在 *crl1-1D* 與 *crl1-2D* 中有較高的表現量（圖三 A, B），而藉由 RT-PCR 則偵測到 At2g36305 在突變株中的表現量也有提高（圖三 C），其餘基因則無明顯差異（圖三 D），因此推測突變株的性狀可能是由 At2g36310 或 At2g36305 被大量表現所造成。

3.4 基因功能預測

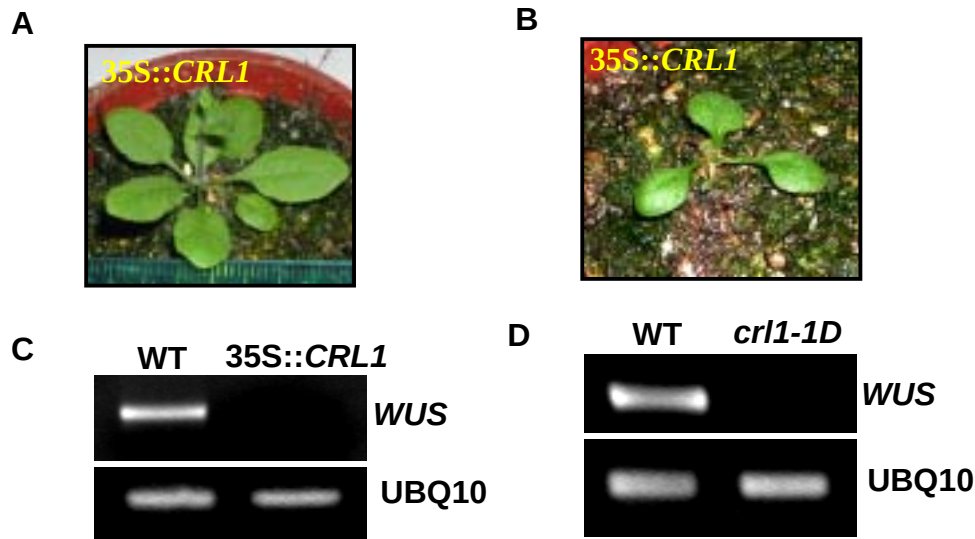
由 Northern blotting 結果得知 At2g36310 在 *crl1-1D* 與 *crl1-2D* 中有較高的表現量，因此將該基因轉殖到野生型中大量表現，得到的轉植株依其性狀可分為二種：一是植株長出的葉片和野生型沒有明顯差異（圖四 A），另外一種植株是長出第一對或第二對真葉後即會停止發育，生長點會被抑制的轉植株（圖四 B），在 103 棵轉植株中觀察到有 6 株出現此現象，類似突變株的其中一種性狀，也和

阿拉伯芥突變株 *wuschel* (*wus*) 的外表型極為相似。因此針對 *WUS* 基因上的專一性區域設計引子進行 RT-PCR，觀察 *WUS* 在野生型、T-DNA 突變株、35S::*CRL1* 轉植株中的基因表現，結果發現這些具生長點抑制性狀的 T-DNA 突變株與 35S::*CRL1* 轉植株中，*WUS* 基因的表現會消失（圖四 C 和 D），並沒有如野生型具有正常的表現。目前已知 At2g36310 基因可能會轉錄出一個類次黃苷/尿嘧啶核苷水解酶(inosine uridine nucleoside hydrolase; IUNH)，已知它是原生動物必需的核酸代謝酵素，但目前在植物體內的功能仍不清楚。藉由在野生型中大量表現 At2g36310 我們發現有部分轉植株產生生長點被抑制的性狀，推測可能是 *WUS* 基因在轉植株中無法表現，造成莖頂分生組織（SAM）的活性消失所致，但目前仍需進一步的研究來加以證實。



圖三 T-DNA 嵌入點鄰近基因表現分析。

- (A)以 At2g36310 基因做探針，*crl1-1D* 的表現量(右)比野生型(左)高
- (B)以 At2g36310 基因全長做探針，*crl1-1D* 的表現量(右)比野生型(左)高。rRNA 與 UBQ10 作為 loading control。
- (C)以 RT-PCR 分析 At2g36305 基因在野生型、*crl1-1D* 與 *crl1-2D* 突變株之表現。在突變株中 At2g36305 有較高的表現量。
- (D) 以 RT-PCR 分析 At2g36300、At2g36320 及 At2g36330 基因在野生型與 *crl1-1D* 突變株中的表現情形。發現均無差異性表現。

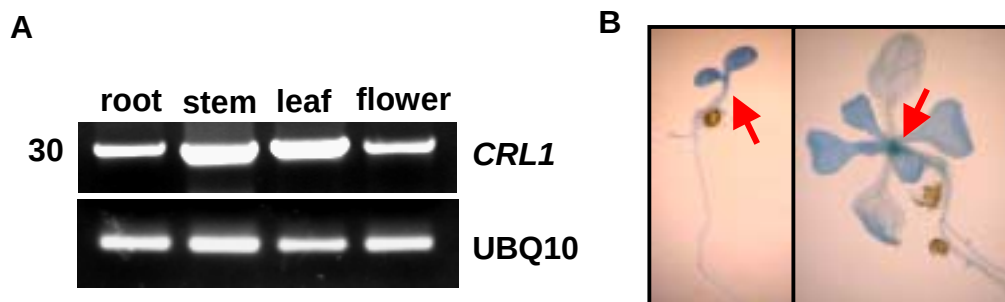


圖四 於野生型植株中大量表現 At2g36310 基因與其功能分析

- (A) 類似野生型性狀的 T₁ 代 35S::CRL1 轉植株。
- (B) 具生長點抑制性狀的 T₁ 代 35S::CRL1 轉植株。
- (C) 針對野生型及具生長點抑制性狀的 35S::CRL1 轉植株進行 RT-PCR，發現 WUS 基因會在野生型中表現，但在轉植株中則沒有訊號產生。
- (D) 同樣以野生型及具生長點抑制性狀的 T-DNA 突變株 *crl1-1D* 進行 RT-PCR，WUS 基因只在野生型中表現。UBQ10 是用以校正相同的 RNA loading 量。

3.5 At2g36310 基因表現位置分析

為了進一步了解 At2g36310 在植物體內的表現位置，針對野生型不同組織部位的 RNA 進行 RT-PCR，另一方面以 genomic walking 方式擴增出該基因啟動子區域 (start codon 上游 1.6 kb 的片段)，將 β -glucuronidase (GUS) 報導基因 (reporter gene) 接在啟動子的後面，轉殖到阿拉伯芥進行 GUS 染色來觀察其表現。結果發現，At2g36310 會在全株植物表現，其中在葉與莖部有較高的表現量。



圖十四 At2g36310 基因表現之定位

- (A) 藉由 RT-PCR 分析 At2g36310 基因的轉錄與表現位置。UBQ10 是用以校正相同的 RNA loading 量。左側數字代表 RT-PCR 的循環次數。
- (B) 8 天 (左) 與 14 天 (右) P_{CRL1}::GUS 轉植株，經由 GUS 染色後的結果。箭頭代表具有高度表現的地方。

參考文獻

- Berna, G., Robles, P., and Micol, J.L.** (2000). A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **152**: 729–742.
- Gopaul, D.N., Meyer, S.L., Degano, M., Sacchettini, J.C., and Schramm, V.L.** (1996). Inosine-uridine nucleoside hydrolase from *Crithidia fasciculata*. Genetic characterization, crystallization, and identification of histidine 241 as a catalytic site residue. *Biochemistry* **19**, 5963-5970.
- Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., and Laux, T.** (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*. **6**, 805-815.
- Krysan, P.J., Young, J.C., and Sussman, M.R.** (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**, 2283-2290.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.
- Versees, W., Decanniere, K., Pelle, R., Depoorter, J., Brosens, E., Parkin, D.W., and Steyaert, J.** (2001). Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*. *J. Mol. Biol.* **5**, 1363-1379.