

批量筛选水稻 T-DNA 插入突变体库 获得生殖发育相关突变体

裴 荣¹ 陆展华² 姚家玲¹

1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070

摘要 针对花器官形态和种子发育突变表型对大型水稻 T-DNA 插入突变体库进行筛选, 获得了大量突变体信息及材料, 在 9 760 个突变体家系中筛选得到 177 个花器官形态和数量异常的突变家系, 突变频率为 1.81%; 对 9 760 个家系中的 3 432 个家系筛选得到 179 个种子发育缺陷的突变家系, 突变频率为 5.22%。对所获得的 270 个突变家系进行了 T-DNA 插入的阳性检测, 阳性率为 64.8%。利用公共数据库 RMD(Rice Mutant Database, RMD) 给定的侧翼序列, 鉴定了其中 1 个结实率较低的突变体家系, 表明其突变表型和 T-DNA 插入共分离, 为深入研究该基因的功能提供了重要的遗传材料。

关键词 水稻; T-DNA 插入突变; 突变表型; 生殖发育; 共分离

中图分类号 S 511.502.4; Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)02-0133-06

水稻(*Oryza sativa*)不仅是全世界最重要的粮食作物, 而且还具有基因组较小且与其他禾本科植物存在广泛的共线性、遗传转化体系完善等优点, 因此, 它已成为研究单子叶植物遗传发育的模式植物^[1]。2005 年国际水稻基因组计划(IRGSP)完成了水稻全基因组测序, 提供了该物种全部的核苷酸序列^[2]。如何揭示这些基因的生物学功能以及它们有序的时空表达机制, 已经成为水稻功能基因组时代的重要课题。植物功能基因组研究策略主要有 2 种: 一是正向遗传学(forward genetics)方法, 即从突变表型出发克隆发生突变的基因, 再确定该基因功能; 二是反向遗传学(reverse genetics)策略, 通过对特定基因序列的分析, 在突变体库中搜寻其相应的突变体, 然后分析突变体表型, 进行相关功能研究^[3]。

采用理化诱变和 DNA 插入突变(insertional mutagenesis)等方法, 创造大量突变体用于基因的功能分析是通过正反向遗传学策略研究植物功能基因组的重要手段。由于农杆菌 T-DNA 整合到植物基因组中的位置是随机的^[4], 并且整合到植物基因组中的 T-DNA 能稳定遗传, 这样随机插入到植物基因组中的已知 T-DNA 序列能为后续的基因功能研究提供一个“标签”, 使得人们可以采用反向

PCR^[5]、TAIL-PCR^[6]、质粒拯救^[7]和接头 PCR^[8]等方法分离 T-DNA 插入位点的侧翼序列, 然后利用侧翼序列来检索基因组数据库便可找到相应的突变基因。因此, T-DNA 插入突变是目前大规模获得水稻突变体的主要方法, 华中农业大学国家植物基因研究中心(武汉)采用该方法成功构建了超过 129 000 株 T-DNA 插入的增强子诱捕系, 并公布了分离得到的 13 804 条侧翼序列^[9]。本研究利用该突变体库, 以花器官形态变异、结实率明显降低这 2 种生殖发育相关表型为筛选目标, 通过 T-DNA 插入的 PCR 阳性检测, 获得 T-DNA 插入与突变表型初步共分离的突变体家系, 为进一步克隆水稻花器官形态发育及种子发育相关基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为华中农业大学国家植物基因研究中心(武汉)构建的水稻 T-DNA 插入突变体库, 是以粳稻品种中花 11(*Oryza Sativa* L. ssp. *japonica* cv. *zhonghua* 11)为受体, 经农杆菌介导 T-DNA 插入所产生的转化群体。所有材料 2009 年夏天(长日条件, 日照时间为 12~14 h 左右)种植在华中农业大学试验田, 每个突变体家系种植 20 个单株, 分 2

收稿日期: 2011-03-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971551)

裴 荣, 硕士研究生, 研究方向: 植物发育生物学, E-mail: peirong@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 姚家玲, 博士, 教授, 研究方向: 植物生殖发育生物学, E-mail: yaojlmly@mail.hzau.edu.cn

行栽插。本试验所观察的水稻 T-DNA 插入家系共 9 760 个。

1.2 突变体表型观察与记载

突变表型判断标准:对于花器官形态,重点考察护颖、颖壳、雌雄蕊的数量与野生型花器官的差异;种子发育缺陷表型是在水稻种子发育的蜡熟期考察结实率(以低于 50%左右为突变标准)。具体观察、筛选方法是将插秧时排布的家系号对应的大田编号制成表格,7 月至 9 月在田间对每个家系、单株逐个观察,记录各个家系的突变单株、突变表型和植株数。

1.3 DNA 抽提和 PCR 检测

1)DNA 提取。DNA 样采用 CTAB 制备法^[10]。

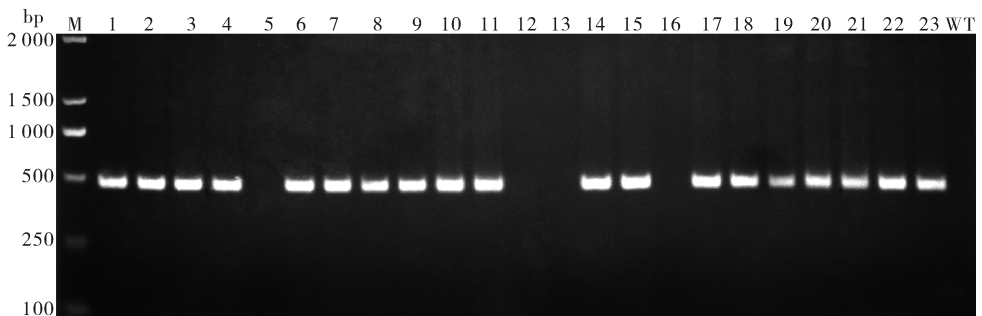
2)T-DNA 阳性检测。以突变家系有表型的单株总 DNA 为模板,根据 T-DNA 序列已知目的基因 GAL4/VP16 设计 PCR 阳性检测引物 GAL/VP-R 和 GAL/VP-F,进行 PCR 扩增,确定有突变表型的单株是否有 T-DNA 插入,初步确定突变家系的表型与 T-DNA 的插入是否共分离。

3)基因型检测。在水稻突变体数据库 RMD (Rice Mutant Database, <http://rmd.ncpgr.cn/>)中查询突变家系的侧翼序列,在候选基因的基因组中跨 T-DNA 插入位点设计上游引物 F 和下游引物 R,在 T-DNA 序列中设计边界引物 NTLB5,分别以 F 和 R、R 和 NTLB5 配对,对突变家系内所有单株进行 PCR 扩增,确定基因型。本实验中所用引物序列见表 1。

表 1 所用引物序列

Table 1 Primers used in the experiment

名称 Name	序列 Sequence
GAL/VP-R	5'-AGACCGCAACAGGATTCAATC-3'
GAL/VP-F	5'-TTCGTCCAGGACAACGTGAACA-3'
F	5'-CTGAAGACCGACGACCGATGA-3'
R	5'-TCAAGTAAAGACCAACGACGCC-3'
NTLB5	5'-AATCCAGATCCCCGAATTA-3'



M: 2 kb DNA ladder; 1~23: 突变体家系 Mutant lines; WT: 阴性对照 Negative control.

图 1 突变体家系 T-DNA 阳性检测

Fig. 1 The PCR positive assay of plants of mutant lines

PCR 反应体系:DNA 模板 1 μ L; 10 \times buffer 2.0 μ L; dNTP 0.4 μ L; 上下游引物各 0.4 μ L; *Taq* 酶 0.2 μ L; 加 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 扩增反应程序为:94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s; 58 $^{\circ}$ C 45 s; 72 $^{\circ}$ C 1.5 min; 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 12 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳 (120 V, 45 min) 检测。

2 结果与分析

2.1 水稻 T-DNA 插入突变体植株 PCR 阳性检测

在田间观察水稻 T-DNA 插入突变体库时,发现有突变表型的家系存在 2 种情况:一种是家系内所有单株全部为同一种突变表型,即表现为标签系内的拟纯合突变,这种情况通常被认为是在组培过程中体细胞变异造成的;另一种则是家系内部分单株表现为突变表型,存在突变植株和正常植株的分离。在后续研究中我们主要关注第 2 种情况。因为 T-DNA 引发的插入突变,在理论上后代会出现表型分离,对于单拷贝 T-DNA 插入的突变体,在其后代株系中,如果群体足够大,表型正常的植株和具有突变表型的植株数应符合 3 : 1 (孟德尔遗传定律) 的分离模式。

根据这一原则,在所观察的 9 760 个家系中筛选到 270 个具有花器官形态异常、种子发育缺陷的突变体家系,随后利用插入片段 T-DNA 序列设计引物,对这些家系进行 T-DNA 阳性检测。采用构建该突变体库转化载体特有的基因 (GAL4/VP16) 设计引物 GAL/VP-R 和 GAL/VP-F,特异扩增片段的大小约为 467 bp (图 1)。扩增结果显示 270 个有突变表型的家系中阳性家系为 175 个, T-DNA 插入阳性率为 64.8%。表明这 175 个家系的突变表型与 T-DNA 标签初步共分离,而其他非阳性家系

的突变表型则不是由 T-DNA 插入造成的。

2.2 花器官形态异常的突变体筛选

通过对水稻 T-DNA 插入的 9 760 个家系进行田间观察,发现有 177 个家系具有花器官形态和数量变异的表型,并且符合 3 : 1 的遗传分离模式,突变比例为 1.81%。

田间拍摄的花器官突变表型如图 2,将突变的小花放在体视显微镜下观察和拍摄,更清楚地显示突变体花器官的异常形态(图 3);野生型水稻的小花由 1 对护颖、1 枚外稃、1 枚内稃(图 3-A)、2 枚浆片、6 枚雄蕊(图 3-H)和 1 枚雌蕊(含 1 个心皮和 2 个柱头)组成(图 3-J)。筛选到的花器官异常表型有:多颖壳(图 2-A,图 3-B、C)、护颖较长(图 2-B,图 3-D)、内稃退化(图 2-C,图 3-F)、顶端小花退化(图 2-D,图 3-G)、芒较长(图 2-E,图 3-E)、小花颖壳畸形(图 2-F)、多雄蕊(图 3-I)以及多雌蕊(图 3-K)等。

2.3 种子发育缺陷突变体筛选

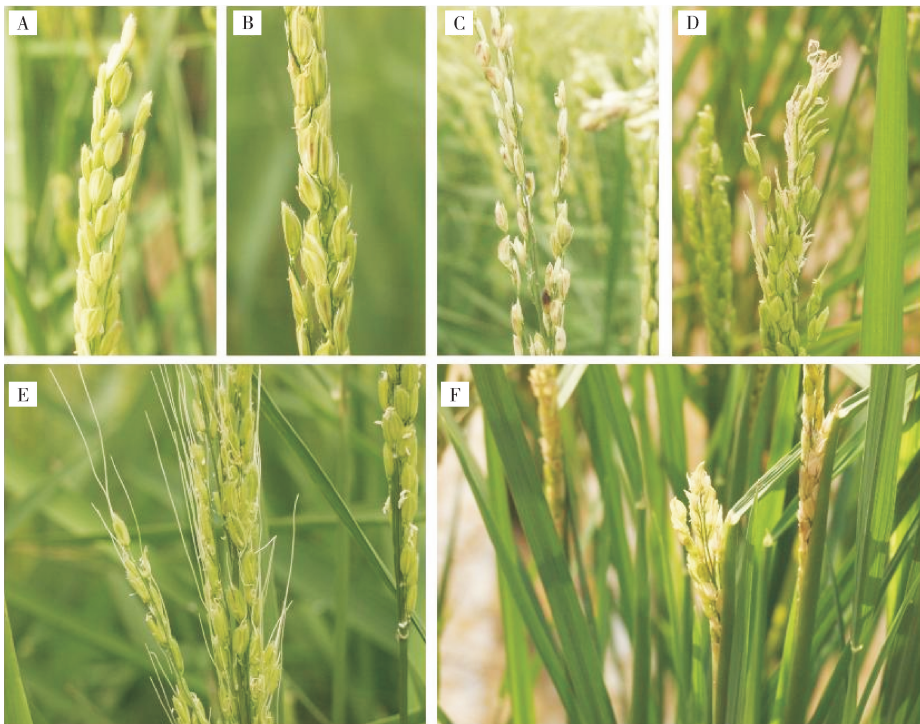
水稻种子发育的蜡熟期,在田间以目测结实率

低于 50%左右为突变标准,对水稻 T-DNA 插入突变体库 9 760 个家系中的 3 432 个家系进行结实率筛选,结果发现其中 179 个突变体家系有结实率下降的显著表型,且符合孟德尔遗传分离模式,突变比例为 5.22%。将结实率降低的突变家系编号与花器官异常突变家系编号对应起来分析,发现其中 78 个结实率下降的突变家系也有花器官形态异常的表型,表明这些家系结实率降低可能与其花器官形态和发育异常有关。

2.4 种子发育缺陷突变体的鉴定

对其中 1 个结实率降低且初步共分离的家系(命名为 *rss1*)进行进一步分析。2009 年夏天该家系的 20 个单株中,5 个单株几乎不结实;2010 年夏天种植该突变体 48 株,发现其结实率低的表型能稳定传递,而且突变体植株和野生型植株在营养生长阶段形态上没有明显差异(图 4)。

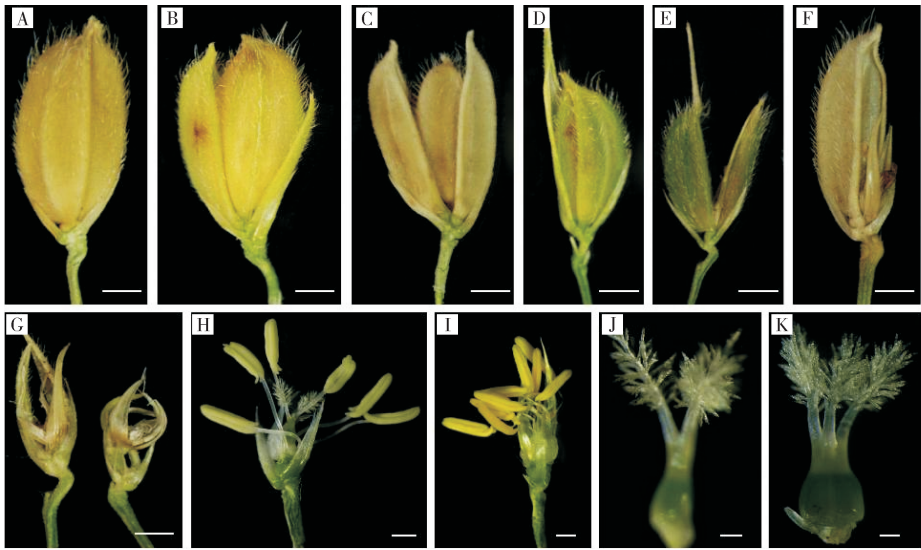
通过在 RMD 中查找,获得了该突变家系 T-DNA 插入片段的侧翼序列。为了检测突变表型与 T-DNA 插入是否共分离,在 T-DNA 插入位置设



A. 多颖壳 Multi-glume; B. 护颖较长 Long sterile lemma; C. 内稃退化 Bract degradation; D. 顶端小花退化 Top floral degradation; E. 芒较长 Long awn; F. 小花颖壳畸形 Floral glume malformation.

图 2 突变体颖花田间表型

Fig. 2 Mutant glume phenotype observed in the field



A:野生型小花外形 Wild-type(bar=2 mm); B-G:突变体小花外部形态 Outside phenotype of the mutant(bar=2 mm); H:野生型小花雄蕊 Stamen of wild-type(bar=1 mm); I:多雄蕊 Polyandry(bar=1 mm); J:野生型小花雌蕊 Pistil of wild-type(bar=0.1 mm); K:多柱头 Polyandrous(bar=0.2 mm).

图 3 野生型和突变体小花表型

Fig. 3 Floral phenotype of the wild-type and the mutant

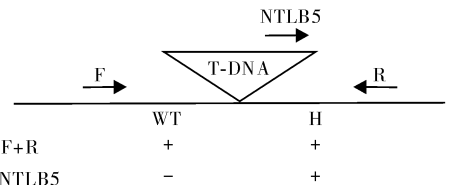


图 4 野生型和 *rss1* 突变表型比较

Fig. 4 Phenotype comparison between WT and the *rss1* mutant plants

计引物,引物 F、R 是来源于基因组的上下游引物, NTLB5 是来源于 T-DNA 标签的边界引物。野生型植株(WT)由于没有 T-DNA 标签序列的插入,所以引物 R 和 NTLB5 组合不能扩增出 PCR 产物,利用基因组引物 F 和 R 组合则可以扩增得到预期大小的产物;在杂合子突变体植株(H)中,利用引物 F 和 R 以及 R 和 NTLB5 组合都可以得到预期大小的 PCR 扩增片段;在纯合突变体植株(M)中,由于 T-DNA 标签的插入导致 F 与 R 配对的扩增产物太大

(约大于 10 kb)而无法得到正常大小的基因组片段,故只有 R 和 NTLB5 配对可以扩增出目的片段(图 5)。



F:特异基因组正向引物 Forward gene-specific primer; R:特异基因组反向引物 Reverse gene-specific primer; NTLB5: T-DNA 边界引物 T-DNA border primer; WT:野生型 Wild-type; H:杂合子 Hemizygous; M:纯合子 Homozygous for T-DNA insertion;

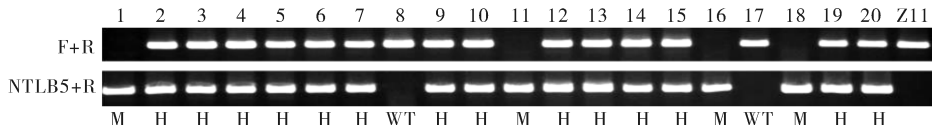
T-DNA 插入侧翼的引物 F 和 R 可扩增得到杂合子或野生型的等位基因产物;用 R 和 NTLB5 扩增到的 PCR 阳性植株表明 T-DNA 在该位点插入;R 和 NTLB5 扩增阳性,而 F 和 R 扩增为阴性,表示该植株为纯合子插入。Primers F and R flank the T-DNA insertion and amplify a product from hemizygous or wild-type allele. PCR-positive plants with R and NTLB5 indicate T-DNA insertion in the examined site. Presence of a product with R and NTLB5 and not with F and R indicates a plant homozygous for the insertion.

图 5 “三引物法”检测突变体家系分离后代植株的基因型

Fig. 5 “Three primers” principle for testing the mutation genotype

通过这种“三引物法”对该突变家系子代的 48 个单株进行了基因型检测,结果表明:T-DNA 插入的纯合植株有 8 株(图 6),杂合植株 38 株,野生型植株 2 株;表型观察结果显示,纯合植株的结实率明显降低,杂合子植株该表型较弱或无此表型,分离出

来的野生型(阴性对照)则没有表型。因此,该家系结实率显著降低的突变表型与该基因被 T-DNA 插入共分离,即突变表型是由 T-DNA 插入到该基因所造成的。



1~20 代表突变家系的后代 Segregants of mutant lines; WT:野生型 Wild-type; H:杂合 Hemizygous; M:纯合 Homozygous for T-DNA insertion; Z11:对照 Control.

图 6 *rssl* 突变家系后代共分离检测结果

Fig. 6 PCR genotyping *rssl* segregants

3 讨论

T-DNA 插入突变体以及所分离到的侧翼序列已在水稻功能基因组研究中发挥了重要作用。许多研究者利用华中农业大学国家植物基因研究中心构建的大型水稻 T-DNA 插入突变体库,分离克隆了一些重要基因。Wu 等^[11]研究和鉴定了一个调控水稻开花时间、影响其生长周期的重要基因 *RID1*; Li 等^[12]克隆和分析了增加水稻茎秆机械强度、与木质素合成相关的基因 *FC1*; Yuan 等^[13]分离和鉴定了影响水稻花粉减数分裂的基因 *PAIR3*; Sun 等^[14]从该突变体库中得到了编码组蛋白去甲基化酶的基因 *JMJ706*,以表观修饰的方式调控水稻生殖发育。随着该突变体库(RMD)更多表型观察数据提交和侧翼序列的分离,将会提供大量的突变体信息和材料供水稻基因组研究所用。

本试验通过对水稻 T-DNA 插入突变体库 9 760 个家系的批量筛选,获得了水稻花器官形态异常和种子发育缺陷的突变体材料 270 多份,而且这些有目标性状突变表型的家系的 T-DNA 插入阳性率达到 64.8%。对其中 1 份种子发育缺陷突变体家系的进一步共分离检测,显示被插入的 1 个水稻未知基因参与调控种子发育。通过这种从突变表型筛选入手的正向遗传学策略,结合侧翼序列分离和进一步共分离检测,有望克隆和鉴定一批控制水稻花器官形态发育和种子形成过程的重要基因,不仅有助于增加人们对水稻生殖发育的认识,也可为水稻的遗传改良提供基因资源。

虽然 T-DNA 插入突变体在对目标基因进行快速定位并确定其功能的研究中具有明显优势^[15],但

是 T-DNA 插入突变体库的利用也有一些局限性。农杆菌介导的 T-DNA 转化通常需要较长的组织培养过程,易造成体细胞变异而非插入突变^[16]。此外,T-DNA 插入的多拷贝、侧翼序列分离等问题也会影响突变体材料的利用。T-DNA 的插入有时还会导致靶位点基因组序列的重排,故在突变体的筛选鉴定过程中必须要进行突变表型和 T-DNA 的共分离检测,以确定突变表型是否真正是由于 T-DNA 的插入所造成的^[17]。

参 考 文 献

- [1] IZAWA T, SHIMAMOTO K. Becoming a model plant; the importance of rice to plant science[J]. Trends Plant Sci, 1996, 1: 95-99.
- [2] International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome[J]. Nature, 2005, 436: 793-800.
- [3] KRYSAN P J, YOUNG J C, SUSSMAN M R. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1999, 11: 2283-2290.
- [4] AZPIROZ-LEECHAN R, FELDMANN K A. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth [J]. Trends Genet, 1997, 13: 152-156.
- [5] WINKLER R, FRANK M, GALBRAITH D, et al. Systematic reverse genetics of transfer-DNA-tagged lines of *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 1998, 118: 743-750.
- [6] LIU Y G, MITSUKAWA N, OOSUMI T, et al. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR [J]. Plant J, 1995, 8: 457-463.
- [7] WEIGEL D, AHN J H, BLAZQUEZ M A, et al. Activation tagging in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2000, 122: 1003-1013.
- [8] COTTAGE A, YANG A, MAUNDERS H, et al. Identification

- of DNA sequences flanking T-DNA insertions by PCR-walking [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001, 19: 321-327.
- [9] ZHANG J, GUO D, CHANG Y, et al. Non-random distribution of T-DNA insertions at various levels of the genome hierarchy as revealed by analyzing 13 804 T-DNA flanking sequences from an enhancer-trap mutant library [J]. *Plant J*, 2007, 49: 947-959.
- [10] SAGHAI-MAROOF M A, SOLIMAN K M, JORGENSEN R A, et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley; mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 8014-8018.
- [11] WU C, YOU C, LI C, et al. RID1, encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor, acts as a master switch from vegetative to floral development in rice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 12915-12920.
- [12] LI X, YANG Y, YAO J, et al. FLEXIBLE CULM 1 encoding a cinnamyl-alcohol dehydrogenase controls culm mechanical strength in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 69: 685-697.
- [13] YUAN W, LI X, CHANG Y, et al. Mutation of the rice gene *PAIR3* results in lack of bivalent formation in meiosis [J]. *Plant J*, 2009, 59: 303-315.
- [14] SUN Q, ZHOU D X. Rice *jmjC* domain-containing gene *JMJ706* encodes H3K9 demethylase required for floral organ development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 13679-13684.
- [15] WAN S, WU J, ZHANG Z, et al. Activation tagging, an efficient tool for functional analysis of the rice genome [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 69: 69-80.
- [16] AN G, JEONG D H, JUNG K H, et al. Reverse genetic approaches for functional genomics of rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 59: 111-123.
- [17] WU C, LI X, YUAN W, et al. Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome [J]. *Plant J*, 2003, 35: 418-427.

Rice mutants of reproductive development obtained from screening the rice mutant library of T-DNA insertional mutagenesis

PEI Rong¹ LU Zhan-hua² YAO Jia-ling¹

1. *College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*
 2. *College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract To identify rice mutants of floral organ and seed development, a rice mutant library of T-DNA insertional mutagenesis constructed by the national key laboratory of crop genetic improvement at Huazhong Agricultural University was screened on large scale. A large number of useful information of mutants were got. Among 9 760 stable lines of phenotype variant, 177 lines showed morphology and number change of floral organ, with mutation frequency of 1. 81%; 179 lines from the 3 432 lines showed abnormal seed development, the percent of mutants was 5. 22%. 270 lines of phenotype variant interested were obtained and 175 lines showed T-DNA insertion through PCR test, the positive rate was 64. 8%, which will lay the foundation for cloning genes related with rice floral organ and seed development. One low seed-setting mutant was identified and confirmed to be cosegregated with its corresponding T-DNA flanking sequences tags, providing an important genetic resource for further studying the function of this gene.

Key words rice; T-DNA insertional mutagenesis; mutant phenotype; reproductive development; cosegregate