

水稻 T - DNA 插入群体的建立及突变体筛选

李子芳, 宋东颖, 张红影, 裴忠有

(天津农学院 农学系, 作物遗传育种重点实验室, 天津 300384)

摘要: 为了给水稻功能基因组学研究提供材料, 利用农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导转化法转化水稻品种日本晴 (*Oryza sativa* L. ssp. japonica cv. Nipponbare), 共建立了 1 833 株独立的水稻 T - DNA 插入群体。T₀ 通过 PCR、GUS 染色和 Southern blot 分析证明了再生植株为转基因植株。随机选取种植 T₁ 种子 20 粒, 进行突变体筛选。通过对各个时期表型的观察和接种试验, 共发现突变体 208 个, 突变率为 11.3%, 表型涉及株高、叶片、穗型、生育期、颖花、颖壳着色、抗病性等。这些突变体不仅创造了具有优良农艺性状的水稻育种材料, 为水稻育种提供新的基因资源, 而且为水稻功能基因组研究打下坚实的基础。

关键词: 水稻; T - DNA; 插入突变; 转基因

中图分类号: S511.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 7091(2009)02 - 0051 - 04

Construction of Rice T - DNA Insertion Population and Screening of Mutants

LI Zi - fang, SONG Dong - ying, ZHANG Hong - ying, PEI Zhong - you

(Key Lab of Crop Genetic and Breeding of Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: It is a primary method to transgene and study functional genome for *agrobacterium tumefaciens* - mediated. Rice cultivar Nipponbare was transformed by this means, and 1 833 independent T - DNA insertion population were obtained. T₀ transgene plants were testified by PCR, GUS and Southern blot, and 20 grain of T₁ seeds were planted to screen mutants in Hainan. 208 mutants were detected by observing all growth stages phenotype and inoculating experiment, and the percent of mutants was 11.3%, and the phenotype of mutants involved with plant height, leaf, growth stage, glume, glume color, resistance to disease and so on. Not only did the mutants provide excellent agronomic traits and new gene resource for rice breeding, but they were helpful to the study of rice functional genome.

Key words: Rice; T - DNA; Insertion mutant; Transgene

随着分子生物学、基因组学、生物信息学的快速发展和水稻基因组计划的实施, 给水稻的生产和育种带来了新机遇。水稻基因组相对小于玉米、小麦等禾谷类作物, 为 $420 \times 10^6 \sim 460 \times 10^6$ b, 基因数 3 万 ~ 5 万个, 被国际上广泛选为模式作物^[1,2]。1998 年, 中国、日本、美国、法国等 11 个国家和地区共同发起并承担了水稻基因组测序计划。随着 2002 年水稻全基因组测序草图和精确测序的完成, 水稻研究重点由结构基因组学开始向功能基因组学转移, 功能基因组学的研究已经成为全球研究的重点。由于基因组序列研究成果的国际共享性, 为人们利用该研究成果进入水稻基因资源的竞争提供了新的机遇。尽管获得了大量水稻基因组序列的数据, 但是

DNA 或蛋白质序列本身并不能为基因的各项生物学功能提供足够的信息。而且由于缺乏其他物种中同源基因和 EST 序列信息, 有相当数量的基因仅限于假想和推测。研究基因功能最直接的方法之一是破坏基因的表达并分析由此带来的表型变化^[3]。由于除了能破坏插入位点基因的表达, 插入的片段还能在分析突变体时用作分子标记, 转座子和农杆菌 T - DNA 插入突变已经成为最广泛应用的方法^[4,5]。由于 T - DNA 插入拷贝数低, 平均每一个转化植株只含 1.5 个拷贝, 而且能在后代稳定遗传, 农杆菌 T - DNA 插入突变已经成为研究功能基因组学应用最广泛的方法, 并在拟南芥和水稻基因组研究中被

收稿日期: 2008 - 12 - 04

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金项目 (20050905); 天津市科技发展计划项目 (06YFGZNC00600)

作者简介: 李子芳 (1978 -), 女, 天津人, 实验师, 硕士, 主要从事作物育种研究。

通讯作者: 裴忠有 (1967 -), 男, 辽宁大连人, 研究员, 博士, 硕士生导师, 主要从事作物遗传育种和分子标记辅助育种研究。

到成功的应用^[6-8],为水稻功能基因组学的发展奠定了基础。本研究用根癌农杆菌介导转化法获得了 1 833 个 T-DNA 插入群体,通过后代筛选获得大量可用于水稻育种和功能基因组研究的突变体新材料。

1 材料和方法

1.1 水稻的转化

通过根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 介导,将双元载体质粒 pCambia1301 (图 1) 的 T-DNA 转入水稻栽培品种日本晴 (*Oryza sativa* L. ssp. japonica cv. Nipponbare) 中。以含 50 mg/L 潮霉素 (hygromycin B) 的培养基筛选水稻转化体,用含 0.1 mg/L IBA 的 1/2 MS 培养基诱导生根,形成完整植株后转入温室中培养^[9]。

图 1 质粒 pCambia1301 图谱

Fig. 1 Map of plasmid pCambia1301

1.2 水稻基因组 DNA 的提取及 PCR 分析

DNA 提取按 McCouch 等的方法进行;PCR 分析是根据载体上潮霉素基因序列设计 1 对潮霉素基因引物 (HA 5'-TGCGCCCAAGCTGCATCAT-3', HB 5'-TGAATCACCAGCGCTGT-3'),在转基因水稻上可扩增出 0.9 kb 的片段^[10]。

PCR 反应是在 MJ-100 PCR 仪上按下列程序完成:预变性 94℃ 5 min;94℃ 1 min,60℃ 1 min,72℃ 1.5 min,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 7 min,4℃ 保存。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上于 1×TAE 缓冲液中电泳检测。

1.3 T-DNA 标记水稻植株的 Southern blot 分析

1 μg DNA 经 *Hind* III 酶切过夜,然后在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳。Southern 杂交按 Amersham 公司提供的方法进行,所用的探针均由引物扩增而获得。

1.4 水稻 GUS 基因的组织化学染色

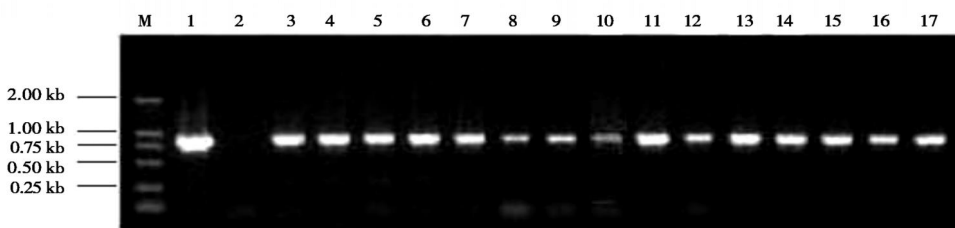
参照王关林等^[11]方法进行,水稻愈伤组织、叶

片、根均取自无菌条件下在培养皿和培养瓶中生长的新鲜愈伤和幼嫩的再生苗。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的 PCR 和 Southern blot 分析

本研究利用根癌农杆菌 EHA105 介导转化法将 T-DNA 插入到水稻染色体中,水稻转化率达到 20%~30%,分化率达到 50%~60%。利用这个体系,已经获得了 1 833 个独立的转基因系,并从中随机抽取了部分转基因株系,进行 PCR 扩增,结果见图 2。用引物 HA 和 HB 对转基因植株 T₀ 基因组中的 *hpt* 基因进行了 PCR 扩增,结果所有被测植株的 PCR 结果都为阳性,证明潮霉素基因已经整合到水稻染色体上,也证明用潮霉素筛选转基因水稻是有效的,同时说明双元载体 pCambia1301 的 T-DNA 很可能已被转入到水稻基因组中。



M. DL2000; 1. 正对照,质粒 pCambia1301; 2. 负对照,非转基因水稻植株; 3~17. 转基因水稻植株。

M. Marker DL2000; 1. Positive control, plasmid pCambia1301; 2. Negative control, non-transgene rice plant; 3-17. Transgene rice plant.

图 2 T-DNA 标记 T₀ 水稻植株的 PCR 分析

Fig. 2 PCR analysis of T₀ rice plants marked by T-DNA

用 *hpt* 基因片段做探针进行 Southern blot 杂交,结果见图 3,通过杂交图片分析可以看出,所有的转基因植株都能够杂交到一条以上的带,而且杂交带大小也不相同,进一步证明了 T-DNA 已整合到水

稻基因组中,而且所得到的转基因水稻株系是相互独立的。由于质粒 pCambia1301 的 T-DNA 仅在 *hpt* 基因上游存在一个 *Hind* III 酶切位点,在检测的 39 个转基因株系中,有 19 个株系含有 1 个拷贝的 T

- DNA ,其他的株系有 2~5 个拷贝的 T- DNA ,平均每个株系有 1.76 个拷贝的 T- DNA ,这与农杆菌介导转化植物的特点相符。

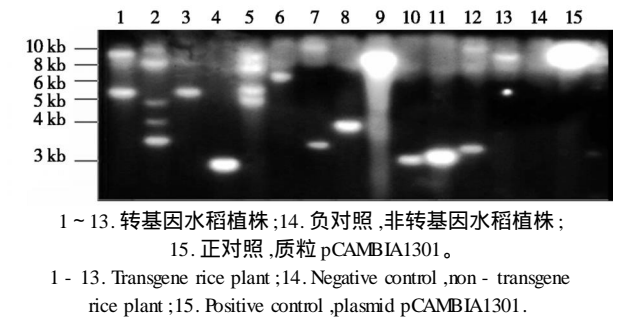


图 3 T- DNA 标记 T₀ 水稻植株的 Southern blot 分析

Fig.3 Southern blot analysis of T₀ rice
plants marked by T- DNA

2.2 转基因植株报告基因的检测

本研究所用的转化载体带有 GUS 基因 ,由独立的 35S 启动子调控。通过直接观察组织器官中 GUS 基因显色反应 ,来判断愈伤组织和植株是否为转基因。随机选取日本晴的抗性愈伤组织、叶片和根经 GUS 染色后 ,均表现蓝色为阳性反应 ,证明 GUS 基因被整合到水稻基因组中并且已经表达 ,这个结果初步说明 ,经过筛选后的愈伤组织为抗性愈伤组织 ,得到的再生植株为转基因植株。

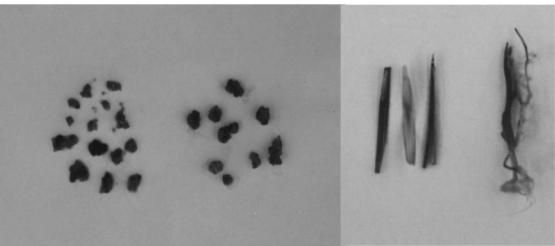


图 4 日本晴抗性愈伤组织、再生植株
叶片和根系的 GUS 染色结果

Fig.4 GUS - staining of positive calli,roots and leaves
of regenerated plants from Nipponbare

2.3 水稻 T- DNA 插入突变体筛选

通过农杆菌介导转化水稻品种日本晴 ,共获得 1 833 个 T- DNA 插入群体。每个系随机选取 20 粒 T₁ 种子进行突变体筛选。通过对各个时期的表型观察和接种试验 ,共发现突变体 208 个 ,突变率为 11.3 % ,表型涉及株高、叶片、穗型、生育期、颖花、颖壳着色、抗病、分蘖等 ,详见表 1。由表 1 可以看出 ,矮秆和花叶突变率比较高。

图 5 为部分典型突变体照片。在株高变异方面 ,有两种突变类型 ,一种是矮秆突变体 ,株高范围 15~45 cm ,矮秆突变体 P743 株高只有 28 cm(图 5 - A) ,明显低于正常日本晴株高(80 cm) ,而且 P927 矮

表 1 突变表型和突变率

Tab.1 Mutant types and mutant percentage

突变类型 Mutant types	突变数 No. of mutants	突变率/ % Mutant percentage
矮秆 Dwarf	114	52.80
绿白相间叶片 Green and white leaves	27	13.00
病斑 Disease spot	12	5.80
生长受限型 Growth restricted	8	3.80
颖花开裂 Gume cracking	7	3.40
闭花,子房膨大,不育 Close ,germen swelling ,infertility	6	2.80
颖壳着色 Gum stained	2	0.96
叶子下垂 Leaves drooped	3	1.40
茎叶扭曲 Stalks and leaves twisted	2	0.96
鞘包穗 Sheathed	5	2.40
叶片黄化 Leaves etiolation	1	0.48
生育期变化 Difference of bearing period	5	2.40
高秆 High straw	4	1.90
接种 R2 后感病 Infected leaves after inoculated R2	5	2.40
白化苗 Albino seedling	3	1.40
多分蘖 More tiller	4	1.90
共计 Total	208	100

秆突变体除了表现矮秆外 ,其叶片表型极其特殊 ,叶片较短、对生、上冲、节间较短(图 5 - B) ;另一种突变体是高秆 ,例如 P380 等 4 个突变体的株高为 100 cm 左右 ,明显比日本晴高。抽穗时期的变异 ,在 208 个突变体中 ,发现有 5 个突变体抽穗时期与日本晴不同 ,其中 X39 抽穗比日本晴提早 8 d ,P1102、P288、P1030、P1284 比日本晴晚 10~16 d ;在分蘖数变异上 ,株系 P406、P411、P444、Q70 的单株分蘖数 6~10 个 ,高于日本晴 2~5 个。叶片变异有几种类型 :绿白相间的叶片、白化叶、假病斑、黄化、叶子下垂等 ,A3004 突变体叶片表现为绿白相间(图 5 - C) ,P936 叶片白化(图 5 - D) ,P645 叶片表现为假病斑(图 5 - E) ,P1170 系表现为叶片黄化 ,P567 表现为叶片下垂(图 5 - F) 。颖花变异 ,有颖花开裂(P1348 株系 ,图 5 - G) 、颖壳着色(P517 ,图 5 - H) 、闭花(P1655) 、颖花变小(P310 ,图 5 - I) 、颖花上长出很多气生根(P877 ,图 5 - J) 。在穗子变异上 ,出现了几个鞘包穗突变体 ,如株系 P1013(图 5 - K) 、P1257 ,穗子被叶子包住 ,抽不出来 ,直接影响水稻的开花授粉 ,严重影响水稻的产量 ,是一个非常有害的性状。在抗性突变方面 ,通过接种白叶枯病生理小种 R2 ,发现感染 R2 的突变体(日本晴抗白叶枯病生理小种 R2) ,结果见图 5 - L。此外 ,还有发生育性突变(不育原因有闭颖不育 ,矮化不育等) 、生长受限制型、叶片扭曲等。这些突变体的存在为水稻种质资源和功能基因组学的研究提供了丰富的材料。

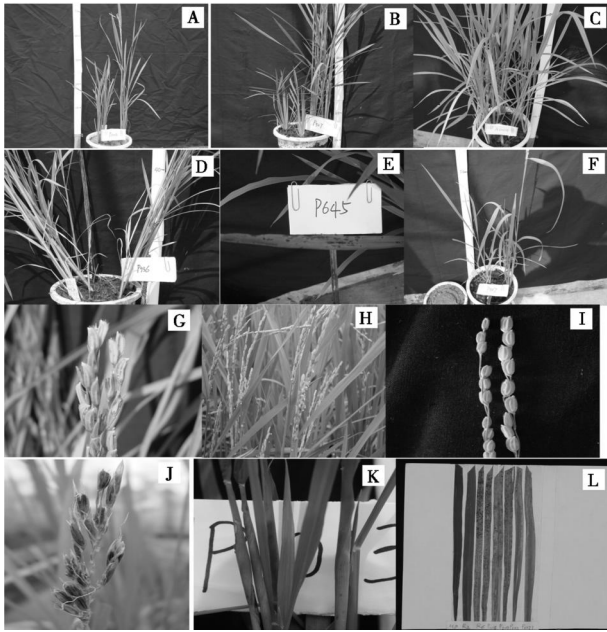


图5 部分突变体的形态特征

Fig.5 Morphological characteristics of some mutants

3 讨论

利用农杆菌 T- DNA 插入突变研究植物功能基因组学是目前普遍采用的方法之一。这种方法在拟南芥^[5]和水稻^[7]中都已应用成功。当然对于不同的研究条件,得出的研究结果有所不同,郝铭^[12]在进行中花 11T- DNA 插入突变体筛选时得到的突变率仅 3.4%,而本研究得到的突变率高达 11.3%。

研究一个基因的功能,最直接的方法是使这个基因突变,并分析由此引起的表型变化^[9]。目前,利用根癌农杆菌转化系统的 T- DNA 插入标签可以快速分离克隆突变相关基因,已越来越受到植物学家的青睐,被认为是植物大规模功能基因组研究的有效方法。而构建足够大的突变体库是功能基因组研究的基础工作^[13]。水稻的基因约有 37 544 个^[14],据推算,以 99% 的概率随机插入一个基因则约需 660 000 个 T- DNA 独立插入事件,考虑到 T- DNA 在水稻的平均插入拷贝数是 1~4,建立一个饱和的水稻突变体库需要 471 000 株 T- DNA 插入标签系^[15]。为此,本研究通过利用水稻 T- DNA 插入获得的插入群体,为克隆基因打下基础。本研究通过筛选利用根癌农杆菌介导法构建了含 1 833 个独立再生转化株系的 T- DNA 插入突变体库,突变发生频率在 11.3% 左右,但是 90% 以上的突变是属于非插入突变,程英豪^[16]等认为,这些非插入突变体很可能是组织培养过程造成,而且经过分析大部分突变体为非共分离突变体。这些非共分离突变体可能是由于组培过程中内源转座子 *Tos17* 跳跃引起

的^[17]。在建立 T- DNA 插入突变体库过程中,出现一些白化苗,这些可能是由于 T- DNA 的插入引起的,当白化苗生长到一定时间,由于缺乏叶绿素合成功能导致不能进行光合作用而死亡。还有一些突变体的花发育不良,不能产生正常的雄蕊和雌蕊,因而得不到种子,限制了对突变体的进一步分析。本试验中还出现了一些优良农艺性状突变体,如不育、半矮秆(株高降低而其他农艺性状无明显变化)等突变性状,这些突变有可能作为新的优良资源供育种直接或间接利用。本试验所观察到的表型仅仅是形态可见的表型,对突变体在生理代谢途径方面的变异还未鉴定,需要进一步进行筛选得到更多的变异类型。

参考文献:

- [1] Goff S A, Ricke D, Lan T H, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) [J]. Science, 2000, 296: 92 - 100.
- [2] Yu J, Hu S N, Wang J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Indica) [J]. Science, 2002, 296: 79 - 92.
- [3] Ramachandran S, Sundaresan V. Transposons as tools for functional genomics [J]. Plant Physiol Biochem, 2001, 39: 243 - 252.
- [4] Azpiroz - Leehan R, Feldmann K A. T- DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: going back and forth [J]. Trends Genet, 1997, 13: 152 - 156.
- [5] Krysan P J, Young J C, Sussman M R. T- DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 1999, 11: 2283 - 2290.
- [6] Weigel D, Ahn J H, Blazquez M A, et al. Activation tagging in Arabidopsis [J]. Plant Physiol, 2000, 122: 1003 - 1013.
- [7] Jeon J S, Lee S, Jung K H, et al. T- DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice [J]. Plant J, 2000, 22: 561 - 570.
- [8] Feldmann K A. T- DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: mutational spectrum [J]. Plant J, 1991, 1: 71 - 82.
- [9] Jeong D H, An S Y, Kang H G, et al. T- DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice plant [J]. Physiology, 2002, 130: 1636 - 1644.
- [10] 翟文学, 李晓兵, 田文忠. 由农杆菌介导将白叶枯病抗性基因 *Xa21* 转入我国的 5 个水稻品种 [J]. 中国科学 (C 辑), 2000, 30(2): 200 - 206.
- [11] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] 郝铭, 阎双勇, 谭震波, 等. 粳稻中花 11T- DNA 插入突变体的分离和鉴定 [J]. 西北农业学报, 2006, 19(5): 777 - 781.
- [13] 江树业. 水稻突变群体的构建及功能基因组学 [J]. 分子植物育种, 2003, 1(2): 137 - 141.
- [14] National Institute of Agrobiological sciences/ institute of the society for techno - innovation of agriculture 1. The map - based sequence of the rice genome [J]. Nature, 2005, 436: 793 - 800.
- [15] 张帆, 金维正, 陈双燕, 等. 质粒营救法和 TAIL - PCR 法获得水稻 T- DNA 旁邻序列的效率比较 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(1): 13 - 18.
- [16] 程英豪, 郑文明, 瞿礼嘉, 等. 插入 T- DNA 片段构建部分水稻突变体株系 [J]. 中国农业大学学报, 2004, 37(3): 313 - 321.
- [17] Ganesh K A, Muneo Y, Masatomo K, et al. Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon *Tos17* insertion. Tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel *OsTATC* gene [J]. Plant Physiol, 2001, 125: 1248 - 1257.