

T-DNA 插入产生的水稻白化苗突变的遗传分析

张泽民¹, 朱海涛¹, 王 江², 高 菊¹, 陈兆贵¹,
刘 芳¹, 宛新杉², 张景六², 张桂权¹

(1 华南农业大学 广东省植物分子育种重点实验室, 广东 广州 510642;

2 中国科学院 上海生命科学研究院 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032)

摘要:在筛选和鉴定水稻 T-DNA(含 Basta 抗性基因 *Bar*)插入纯合体的过程中,观察到 1 个白化苗的突变体. 对该突变体进行遗传分析表明,分离群体出现绿苗和白化苗 2 种类型,其分离比率为 3:1,符合 1 对基因的显性遗传. Basta 抗性检测、PCR 分子检测及 Southern 杂交证实,该突变体是由单一 T-DNA 插入所引起的,白化苗性状与 T-DNA 共分离. 该突变材料可用于插入座位的基因克隆.

关键词:水稻; 白化苗突变体; T-DNA 插入; 遗传分析

中图分类号:Q74

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)03-0001-05

Genetic Analysis of an Albino Mutation by T-DNA Insertion in *Oryza sativa* L.

ZHANG Ze-min¹, ZHU Hai-tao¹, WANG Jiang², GAO Ju¹, CHEN Zhao-gui¹, LIU Fang¹,
WAN Xin-shan², ZHANG Jing-liu², ZHANG Gui-quan¹

(1 Guangdong Provincial Key Lab of Plant Molecular Breeding, South China Agric. Univ.,

Guangzhou 510642, China; 2 State Key Lab of Plant Molecular Genetics, Shanghai

Institutes for Biological Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: T-DNA tagging was used to isolate genes in higher plant. In this study, an albino mutant caused by T-DNA insertion in rice was identified. Genetic analysis of the mutant showed that the two types of phenotype, normal and albino in the segregating populations derived from the T-DNA heterozygotes, fit the ratio of 3:1. Test for Basta resistance showed that all of the albino plants were resistant while the normal plants segregated for resistant and susceptible by the ratio of 2:1. The results indicated that the albino mutant co-segregated with Basta resistance. The albino mutant caused by T-DNA insertion confirmed by T-DNA detection using PCR method and Southern blot. This albino mutant was useful for isolation of the tagged gene in rice.

Key words: *Oryza sativa*; albino mutant; T-DNA insertion; genetic analysis

水稻突变体是培育水稻新品种和水稻功能基因组学研究的基础材料. 突变体既可作为新的种质直接用于水稻的遗传改良,又可用于突变基因的克隆和功能研究. 产生水稻突变体的方法主要有理化诱变、T-DNA 插入、转座子插入和逆转座子插入

等^[1],其中利用 T-DNA 随机插入水稻基因组来产生突变体并以 T-DNA 为标签分离突变基因的方法得到了广泛应用,人们构建了多个水稻 T-DNA 插入突变体库^[2-10],也从中分离到了一些水稻基因^[11-13]. 为了分离水稻的基因并研究基因的功能,

收稿日期:2006-12-20

作者简介:张泽民(1973—),男,讲师,在取博士研究生;通讯作者:张桂权(1957—),男,教授,博士,E-mail:gqzhang@scau.edu.cn

基金项目:国家重点基础研究规划(G19990116);国家自然科学基金(30571145)

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所构建了玉米的 *Ac/Ds* 转座因子系统^[5],在这个系统的 T-DNA 区域中插入了 *Ds* 因子,同时在 *Ds* 因子中插入了对除草剂 Basta 抗性的 *Bar* 基因,以追踪转化植株后代中是否存在 *Ds* 因子;以梗稻 *Oryza sativa* L. subsp. *japonica* 中花 11 为转化对象,通过根癌农杆菌介导方法,建立了 T-DNA 转化群体. 在这个转化群体中,观察到了一些植株表型的突变,主要包括黄化苗、白化苗、矮化和株型变异等^[14-19]. 本文报道了 1 个由于 T-DNA 插入所引起的白化苗突变体,并对突变体进行了遗传分析,为进一步克隆该基因并进行功能分析奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

白化苗突变体从质粒 pDsBar1300 转化梗稻 *Oryza sativa* L. subsp. *japonica* 中花 11 的转化群体(由中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所提供)中分离得到. 质粒 pDsBar1300 在 T-DNA 区携带 *Ds* 转座子,*Ds* 的内部插入 *Bar* 基因,能提供对 Basta (商用除草剂,有效成分为 phosphinothricin, PPT 麟丝菌素)的抗性,在 T-DNA 区还携有潮霉素磷酸转移酶基因 *Hpt*,能提供对潮霉素的抗性^[5].

1.2 方法

1.2.1 Basta 抗性鉴定 在水稻分蘖期和抽穗期共进行 2 次 Basta 检测,Basta 检测参见陈兆贵等^[14]的方法.

1.2.2 PCR 检测 PCR 检测参见陈兆贵等^[14]的方法,所用引物为 *DsP1* (5'-GGATGAAAACGGTCGGTACG-3') 和 *DsP2* (5'-TGAAGATGTAGCAAGTGCTCC-3'),可特异性扩增长度为 528 bp 的 *Ds* 因子片段.

1.2.3 DNA 抽提 水稻叶片总 DNA 抽提参见 Murray 等^[20]的方法.

1.2.4 Southern blotting 分析 参照 Sambrook 等^[21]的方法进行. 取 10~15 μ g 水稻叶片总 DNA 限制性内切酶 *Hind* III 进行消化,7 mg/L 琼脂糖电泳分离,毛细管法转到尼龙膜上,真空烘干. *Ds* 因子的部分序列(以 *DsP1*、*DsP2* 为引物,从质粒 pDsBar1300 中扩增得到的 DNA 序列)用随机引物标记法进行标记后作为探针,杂交、洗膜后,尼龙膜放在 X 光片上 -70 $^{\circ}$ C 条件下 3~7 d 得到放射自显影像.

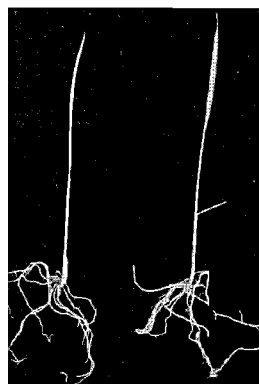
1.2.5 突变体的种植 T-DNA 转化材料 $T_1 \sim T_4$ 代种植于华南农业大学教学农场. 2003 年早季种植 T_1 代,每个株系约 20 个单株,用于筛选表型变异的

材料. 2003 年晚季至 2004 年晚季分别种植白化苗突变体的 $T_2 \sim T_4$ 代,每代均种植突变杂合体和绿苗 2 个群体,每个群体每代种植 100~200 个单株,用于白化苗突变体的遗传分析.

2 结果与分析

2.1 白化苗突变体的性状表现

对 T-DNA 插入株系(insertion lines, ILs)的后代进行全生育期观察,从中筛选到白化苗的突变体材料,株系编号为 IL410(图 1). 种子出芽后可见白化苗,整个植株全白,至三叶期枯死.



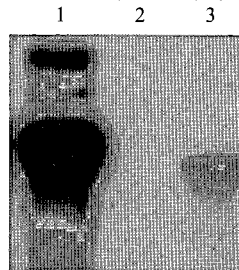
左:对照中花 11; 右:突变纯合体
left: normal plant; right: homozygote

图 1 IL410 突变体的表型

Fig. 1 The phenotypes of mutant IL410

2.2 白化苗突变体 IL410 中 T-DNA 插入位点数目的 Southern blot 检测

图 2 为 Southern 杂交检测结果. 整合到水稻基因组中的 T-DNA 区有 2 个 *Hind* III 切点,转化水稻总 DNA 经 *Hind* III 完全消化后,T-DNA 区会产生 3 个 DNA 片段,右侧片段一端与水稻基因组相连,如果 T-DNA 在水稻基因组中有多位点插入,则会有多



1: pDsBar1300; 2: 中花 11; 3: IL410

1: *Hind* III digest of the plasmid pDsBar 1 300; 2: *Hind* III digest of the total DNA isolated from seedlings of Zhonghua 11; 3: *Hind* III digest of the total DNA isolated from seedlings of IL410

图 2 IL410 基因组中 T-DNA 插入位点数目的 Southern 杂交分析

Fig. 2 Southern blot analysis for detecting the copies of T-DNA integrated into the genome of IL410

个长度不同的片段出现. 因此以右侧 DNA 片段中的 Ds 因子的部分片段为探针(以 DsP1、DsP2 为引物, 从质粒 pDsBar1300 中扩增得到的 DNA 序列)Southern 杂交后根据专一性杂交条带的数目来判断水稻基因组中 Ds 因子的插入位点数, 从而确定 T-DNA 插入位点数. 图 2 的结果表明, 水稻转化植株 IL410 只出现了 1 条约 2 kb 的专一性杂交条带, 表明 T-DNA 在 IL410 的基因组中是单位点整合.

2.3 突变性状的遗传

从 T₂ 代开始, 连续 3 个世代对 IL410 的突变性状进行了遗传分析(表 1). 结果表明: 在不同世代, 分离群体均出现 3:1 的绿苗和白化苗的分离, 说明突变性状能稳定遗传, 是可遗传的变异; 在同一分离世代, 不同株系的植株均出现绿苗和白化苗 2 种类型, 分离比率符合 3:1, 表明白化苗突变是由 1 对基因所控制.

表 1 IL410 突变性状的分离
Tab. 1 Segregation of the albino phenotype in the populations derived from the heterozygotes of mutant IL410

世代 generation	株数 no. of plants				χ^2 (3:1)	P
	合计 total	正常 normal	白化苗 albino	比值 ratio		
T ₂	895	670	225	2.977 8	0.093 1	>0.90
T ₃	945	713	232	3.073 3	0.101 9	>0.90
T ₄	886	661	225	2.937 8	0.073 7	>0.90

2.4 突变性状与 Ds 共分离

在 T₂~T₄ 代, 对 IL410 分离群体中绿苗的 Basta 抗性进行了遗传分析. 结果(表 2)表明: 在不同的分离世代, 杂合体分离群体中绿苗 Basta 的抗感分离比率符合 2:1, 符合单基因的遗传模式, 表明 Bar 基因是以单拷贝方式插入到水稻染色体上, 并能稳定遗传给后代; 在同一分离世代, 绿苗植株部分表现出对

Basta 抗性, 部分表现出对 Basta 敏感, 且前者对后者的比率符合 2:1, 继续同时选取对 Basta 抗性和对 Basta 敏感植株的后代进行种植观察, 结果显示对 Basta 抗性植株后代出现绿苗和白化苗 2 种类型植株, 且符合 3:1 的分离比, 而对 Basta 敏感植株的后代全部为绿苗, 未出现分离. 这些结果证实了白化苗突变与 Basta 抗性共分离.

表 2 突变体分离群体中绿苗 Basta 抗性的分离
Tab. 2 Segregation of the Basta resistance in normal populations derived from the heterozygote of IL410

世代 generation	株数 no. of plants				χ^2 (2:1)	P
	合计 total	抗 resistant	感 susceptible	比值 ratio		
T ₂	400	270	130	2.076 9	0.125 0	>0.90
T ₃	415	276	139	1.985 6	0.004 8	>0.90
T ₄	344	230	114	2.017 5	0.005 8	>0.90

2.5 突变体基因组的 PCR 分析

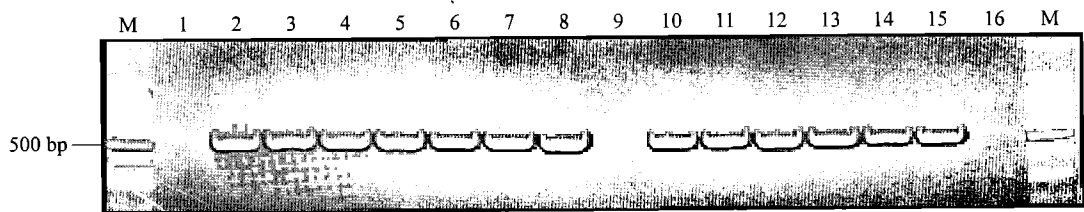
为了进一步从分子水平上验证 IL410 白化苗突变性状与 T-DNA 之间存在共分离关系, 用 T-DNA 内部的 Ds 上 1 对引物 DsP1 和 DsP2 对 IL410 部分植株进行 PCR 扩增. 结果(表 3)表明: 绿苗中表现出

对 Basta 抗性的植株及未进行 Basta 抗性检测的白化苗植株, 均能检测出 1 条 528 bp 的特异带; 而绿苗中表现出对 Basta 敏感的植株, 无特异性的扩增带出现(图 3). 这表明 IL410 的白化苗突变性状与 T-DNA 的插入有相关性.

表3 IL410 突变体分离群体中 T-DNA 的 PCR 检测

Tab.3 T-DNA examination in the populations derived from the mutant IL410 by PCR method

表型 phenotype	T-DNA 检测株数 no. of plants for T-DNA examination		合计 total
	有 present	无 absent	
白化苗植株 albino plant	30	0	30
叶色正常抗 Basta 植株 Basta resistant of normal plant	60	0	60
叶色正常感 Basta 植株 Basta susceptible of normal plant	0	30	30
合计 total	90	30	120



M:100 bp ladder; 1:中花 11; 2:IL410; 3-16 为 F₂ 群体,其中 9 和 16 是正常植株,其他是白化苗植株

M:100 bp ladder; 1:Zhonghua 11 plant; 2:IL410 plant; 3-16 are F₂ population,among 9 and 16 are normal plants,others are albino plants

图3 IL410 白化苗突变体分离后代的 PCR

Fig.3 T-DNA detection in the segregates derived from the heterozygote of IL410 by PCR method

根据上述结果可以认为,在 IL410 突变体中,由于 T-DNA 的插入导致了 1 个控制叶色的基因发生了突变,使该基因的功能发生了改变,致使突变体表现出白化苗.

3 讨论

叶色变异是比较常见的突变性状,多数在苗期表达,易于识别. 突变基因往往是直接或间接影响叶绿素的合成和降解,改变叶绿素的含量,从而影响光合效率,造成作物减产,甚至导致植株死亡;同时在基础研究中,叶色突变体是研究植物光合作用、光形态建成、激素生理及抗病机制等一系列生理代谢过程的理想材料,因而叶色突变体作物生产应用和基础研究均具有重要意义. 目前被子植物中叶绿素合成途径研究较为清楚,叶绿素形成从谷氨酰-tRNA 开始到叶绿素 a、b 合成结束,合成途径中大部分的关键酶都已经被鉴定出来^[22],还利用叶色突变体验证了谷氨酰-tRNA 还原酶^[23]、原叶绿素酸酯氧化还原酶(NADPH)^[24]和叶绿素合成酶^[25]等关键酶在叶绿素合成过程的功能.

用 T-DNA 插入植物基因组来构建突变库已成为植物功能基因组学研究的一个重要途径^[26],仅拟

南芥就有 40% 的突变基因是用 T-DNA 标签法克隆的^[27]. 近年来,国内外众多研究人员采用不同的 T-DNA 标签系统构建了大量水稻 T-DNA 插入突变体^[2-10],从中分离到了一些水稻基因^[11-13]. T-DNA 标签法分离水稻基因和分析基因功能离不开筛选和鉴定各种类型的水稻突变体的基础性工作. 通过对水稻 T-DNA 插入纯合体的筛选和鉴定,笔者已经获得了一批水稻 T-DNA 插入纯合体^[14],并从中筛选到了 1 个水稻白化苗突变体. 本研究进一步表明,该白化苗突变体是由单基因控制的,为单基因显性遗传;该基因的突变是单一 T-DNA 插入引起的. 这一新的水稻白化苗突变体的获得,为进一步克隆控制该性状的基因奠定了基础. 下一步将克隆该基因并深入研究该基因的功能以及与其他控制叶绿素合成基因的相互关系,为采用基因工程技术培育高光效的水稻品种奠定基础.

参考文献:

[1] JEON J S,AN G. Gene tagging in rice:a high throughput system for functional genomics[J]. Plant Sci,2001,161 (2):211-219.

[2] JEON J S,LEE S,JUNG K H,et al. T-DNA insertional

- mutagenesis for functional genomics in rice[J]. *Plant J*, 2000, 22(6):561-570.
- [3] JEONG D H, AN S, KANG H G, et al. T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(4):1636-1644.
- [4] RYU C H, YOU J H, KANG H G, et al. Generation of T-DNA tagging lines with a bidirectional gene trap vector and the establishment of an insertion-site database[J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54(4):489-502.
- [5] 王江, 李琳, 宛新杉, 等. 插入玉米 Ds 转座因子的水稻转化群体及其分子分析[J]. *植物生理学报*, 2000, 26(6):501-506.
- [6] 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(3):418-427.
- [7] CHEN S, JIN W, WANG M, et al. Distribution and characterization of over 1 000 T-DNA tags in rice genome[J]. *Plant J*, 2003, 36(1):105-113.
- [8] SHA Y, LI S, PEI Z, et al. Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population[J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108(2):306-314.
- [9] SALLAUD C, MEYNARD D, VAN BOXTEL J, et al. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(8):1396-1408.
- [10] SALLAUD C, GAY C, LARMANDE P, et al. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: A first step towards in silico reverse genetics[J]. *Plant J*, 2004, 39(3):450-464.
- [11] JUNG K H, HUR J, RYU C H, et al. Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene-trap system[J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(5):463-472.
- [12] LEE S, JUNG K H, AN G, et al. Isolation and characterization of a rice cysteine protease gene, OsCP1, using T-DNA gene-trap system[J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54(5):755-765.
- [13] OIKAWA T, KOSHIOKA M, KOJIMA K, et al. A role of OsCA20ox1, encoding an isoform of gibberellin 20-oxidase, for regulation of plant stature in rice[J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 55(5):687-700.
- [14] 陈兆贵, 王江, 张泽民, 等. 水稻 Ds 插入纯合体的筛选和鉴定[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2003, 29(4):337-341.
- [15] 陈兆贵, 王江, 张泽民, 等. T-DNA(Ds)插入引起的水稻迟抽穗突变体的遗传分析[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(1):75-80.
- [16] 陈兆贵, 王江, 张泽民, 等. T-DNA(Ds)插入产生的水稻卷叶突变的遗传分析[J]. *华南农业大学学报*, 2006, 27(1):1-4.
- [17] 王新其, 殷丽青, 沈革志. 水稻矮秆突变体的遗传分析[J]. *上海农业学报*, 2002, 18(2):19-23.
- [18] 张梅芳, 张景六. 插入含 Ds 因子的 T-DNA 产生的水稻脆秆突变株的遗传和分子分析[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2002, 28(2):111-116.
- [19] 张泽民, 朱海涛, 王江, 等. T-DNA 插入产生的水稻多分蘖突变的遗传分析[J]. *作物学报*, 2006, 32(11):1737-1741.
- [20] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8(19):4321-4325.
- [21] SAMBROOK J, FRITSCH E, MANIATIS T. *Molecular cloning: A laboratory manual*[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:474-490.
- [22] BEALE S I. Green genes gleaned[J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(7):309-312.
- [23] KUMAR A M, SOLL D. Antisense HEMA1 RNA expression inhibits heme and chlorophyll biosynthesis in arabidopsis[J]. *Plant Physiol*, 2000, 122(1):49-56.
- [24] FRICK G, SU Q, APEL K, et al. An *Arabidopsis* porB porC double mutant lacking light-dependent NADPH: protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested[J]. *Plant J*, 2003, 35(2):141-153.
- [25] GAUBIER P, WU H J, LAUDIE M, et al. A chlorophyll synthetase gene from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Mol Gen Genet*, 1995, 249(1):58-64.
- [26] MARTIENSSEN A R. Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(5):2021-2026.
- [27] MEINKE D W, MEINKE L K, SHOWALTER T C, et al. A sequence-based map of *Arabidopsis* genes with mutant phenotypes[J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(2):409-418.

【责任编辑 周志红】