

研究报告

Research Report

水稻中花 11 号 *Tos17* 插入突变体库的创制

马振[✉], 陈国兴[✉], 吴昌银[✉]

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北省武汉市, 430070

✉ 通讯作者及电子邮件: cywu@mail.hzau.edu.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2010年, 第8卷, 第9篇 DOI: 10.5376/mpb.cn.2010.08.0009

收稿日期: 2010年09月21日

接受日期: 2010年10月24日

发表日期: 2010年11月03日

这是一篇开放阅读的论文, 其论文发布和传播接受《Creative Commons Attribution License》所有条款。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许和同意第三方无条件的使用、传播以及任何媒介的复制或再制作。

建议最佳引用格式:

马振等, 2010, 水稻中花 11 号 *Tos17* 插入突变体库的创制, 分子植物育种 Vol.8 No.9 (DOI: 10.5376/mpb.cn.2010.08.0009)

摘要 基因标签技术是植物功能基因组研究的一种重要策略。本研究利用水稻反转录转座子 *Tos17* 创建了水稻品种中花 11 号的突变体库, 该突变体库包含 15,543 个独立再生株系。Southern 杂交证明中花 11 号中含有 4 个 *Tos17* 原始拷贝, 经过 3 个月的组织培养, 平均每个再生植株中含有 1.4 个新的转座拷贝, 据此推测本突变体库中含有约 21 760 个新的 *Tos17* 插入位点。利用接头 PCR 技术分离到 *Tos17* 转座位点侧翼水稻基因组序列 524 条, 大约 310 个功能基因带有标签。侧翼序列的分析结果表明, *Tos17* 显著偏爱于插入基因区, 而显著不偏爱于插入基因间隔区和转座因子相关区。在基因编码区内, *Tos17* 显著偏爱插入基因的外显子区域。对 *Tos17* 插入突变体 T₁ 代 1 881 个家系进行了突变表型的筛选, 结果显示约 97 个(5.15%)家系表现出明显的突变表型, 其中以植株矮化、不育的突变体占多数。本研究证明 *Tos17* 突变体库是水稻功能基因组研究的有用资源。

关键词 水稻突变体库; *Tos17* 反转录转座子; 侧翼序列; 功能基因组学

Development of a *Tos17* Insertional Mutant Library in the Rice Variety Zhonghua 11

Ma Zhen[✉], Chen Guoxing[✉], Wu Changyin[✉]

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070

✉ Corresponding author, cywu@mail.hzau.edu.cn; ✉ Authors

Abstract Gene tagging was a powerful strategy for gene annotation in plant genome. In this study, we have generated 15,543 independent lines employing an endogenous transposon *Tos17* as a tagging in Zhonghua 11 (*japonica* cv.) genome. Southern blot hybridization showed that Zhonghua 11 contained four native *Tos17* copies in its genome. Underwent 3 months cultivation, every generation lines had 1.4 new transposition copies number on average. It was estimated that a total of 21 760 new insertion sites in the rice genome was tagged in this *Tos17* insertional library. Employing adapter-PCR method, more than 524 *Tos17* flanking sequence had been isolated and approximately 310 genes had been tagged. A comprehensive analysis of the flanking sequence revealed that *Tos17* prefers to insert into genic region rather than the TE-related region and intergenic region. In the coding region, *Tos17* strongly favored the exon region. Morphological screen was carried out for 1,881 T₁ generations under normal field growth condition and 97 (5.15%) conspicuous mutants were collected. The popular mutant phenotypes were dwarf and sterility. It was verified that our *Tos17* insertional library was a useful resource for functional analysis the rice genome.

Keywords Rice mutant library; *Tos17* retrotransposon; Flanking sequence; Functional Genomics

研究背景

水稻是重要的粮食作物, 由于其基因组小、精确的全基因组序列及高效的遗传转化体系, 已成为作物功能基因组研究的模式植物。在功能基因的研究中, 突变体对于基因的鉴定和阐释发挥着重要的作用。然而, 基因自然突变的频率很低, 人为创建大型突变体库已成为植物功能基因组研究的重要平台。目前构建植物突变体的方法主要可分为物理

方法、化学方法和利用基因标签技术如农杆菌 T-DNA 插入、转座子插入等方法。以快中子为代表的物理方法和双环氧丁二烯(DEB)、甲基磺酸乙酯(EMS)为代表的化学诱变的方法虽然可以很快的得到突变体, 但是突变体的表型和被突变的基因之间的联系很难找到, 只能通过图位克隆的方法来分离基因。因此, 构建突变体库最有效的方法是利用 T-DNA 或转座子等插入元件来构建突变体库。由于插入元件序

列已知, 鉴定插入位点基因组序列容易, 因此突变表型和被突变的基因之间的联系很容易建立, 已成为植物功能基因分离鉴定的重要策略之一(Krishnan et al., 2009)。在近十年内, 各国科学家在水稻中利用T-DNA或转座子已经创建了大量的突变体(Martienssen 1998; Jeon et al., 2000; Wu et al., 2003; Hirochika et al., 2004)。虽然已经创建了大量的突变体, 然而只有50%的水稻基因被“标记”, 因此还需要利用各种不同的方法创建插入标签, 使每一个基因都能被“标记”(Krishnan et al., 2009)。

*Tos17*是水稻中的一个内源的复制型反转录转座子, 全长4 114 bp, 在栽培稻中含有1-5个拷贝(Cheng et al., 2006), *Tos17*已被用于创建水稻转座子插入突变体库。Hirochika等在1996年发现了15个水稻中的反转录转座子, 其中*Tos10*, *Tos17*, *Tos19*在组培的条件下被激活。后经过大量研究后发现*Tos17*具有以下优点: (1) *Tos17*在组培的条件下激活, 分化成植株后失活, 因此*Tos17*插入引起的突变可以稳定遗传; (2) *Tos17*的拷贝数随着组培的时间而增多, 在5个月的组培时间下, 可平均产生10个拷贝, 可以通过控制组织培养时间来控制转座的拷贝数; (3) *Tos17*突变体的产生不涉及转基因过程, 因此在一些转基因控制严格的国家也可以使用。(4) *Tos17*的转座是随机的并能覆盖整个基因组(Miyao et al., 2003; Piffanelli et al., 2007)。Miyao等(2007)构建了超过50,000个独立的再生植株, 大约含有500,000个插入位点并对突变产生的表型进行了分类。并且分离克隆一些重要基因例如控制同源染色体配对的基因*Pair1* (Nonomura et al., 2004a)和*Pair2* (Nonomura et al., 2004b)。

中花11号是一个典型的粳稻品种, 由于其遗传转化效率高、栽种地区适应性强, 已成为我国水稻功能基因组研究的模式品种之一。本实验室利用水稻品种中花11号创建了超过120 000独立的T-DNA插入突变体(Wu et al., 2003; <http://rmd.ncpgr.cn/>)。农杆菌介导的T-DNA转化经历了组培过程, 研究发现*Tos17*在转化体中有新的转座(Long et al., unpublished)。然而, 由于不同批次的转化植株组培时间不一样, *Tos17*在有些批次的材料中没有转座或转座的位点较少, 难以采用高通量的方法批量鉴定我室T-DNA库中*Tos17*的插入位点。同时为了丰富水稻的突变体资源, 实现水稻全基因组饱和突变体的目标, 本研究利用水稻中花11号为材料, 创建了水

稻*Tos17*突变体库。本研究共创建独立的水稻*Tos17*突变体15 543株, 分离非重复插入位点侧翼序列524条, 并对T₁代1,881个家系进行了表型筛选。本研究为丰富了水稻突变体资源、发掘分离水稻重要功能基因奠定了基础。

1 结果与分析

1.1 组织培养时间决定*Tos17*转座的拷贝数

由于不同水稻品种中*Tos17*的拷贝数不一致, 且组织培养的时间导致*Tos17*新的插入拷贝不一样。为了研究中花11号及不同组织培养期后*Tos17*的拷贝数, 我们采用Southern杂交的方法, 利用*Tos17*的特异探针检测了不同样本中*Tos17*的拷贝数。如图1所示, 野生型中花11号中含有4个拷贝, 愈伤组织继代1个月后分化出的植株中能检测到*Tos17*的新拷贝, 说明*Tos17*的转座在组织培养的初期就有可能发生转座。在愈伤组织继代培养2个月的情况下, 愈伤组织分化出的植株中几乎都含有1个*Tos17*的新拷贝。在继代3个月的愈伤组织分化出的每个植株中都可以检测到*Tos17*新拷贝, 新拷贝数为1-3个。随着愈伤组织培养时间的延长, 分化出的植株中的新拷贝数增加。考虑到要保证植株中都含有至少一个*Tos17*的新拷贝, 而且较少的拷贝数有利于对突变体与插入标签的共分离, 本研究确定3个月的愈伤组织继代的再生植株来大规模构建的*Tos17*插入突变体库。

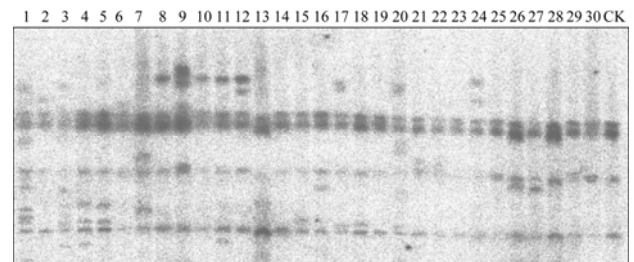


图1: 愈伤组织不同继代时间再生植株中*Tos17*的拷贝数
 注: Line 1-10: 继代3个月; Line 11-20: 继代2个月; Line 21-30: 继代1个月; CK: 野生型中花11号对照

Figure 1 The copy number of *Tos17* in the regenerated rice plant underwent different calli culture time

Note: Line 1-10, for 3 months; Line 11-20, for 2 months; Line 21-30, for 1 month; Ck, Variety Zhonghua 11 as a control

1.2 创建*Tos17*转座突变体库

将中花11号成熟种子放于N₆培养基上, 经过大约45天左右产生胚性愈伤组织, 然后挑选结构紧实、颜色鲜黄的胚性愈伤组织转移到继代培养基上

继代3个月, 以激活*Tos17*的转座, 愈伤组织诱导、继代、分化的过程如图2所示。为了避免来自同一愈伤组织分化出的植株含有相同的插入位点, 愈伤组织从诱导、继代到分化, 每一颗愈伤都是独立培养, 每颗愈伤上分化出的植株只取一株。我们大约诱导了超过30 000粒中花11号种子, 产生出大约22 000颗愈伤, 最后获得独立的水稻中花11号*Tos17*突变体15 543株。

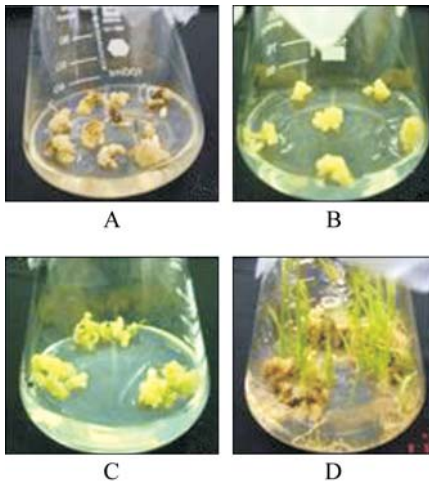


图2. *Tos17* 突变体的创建过程
 注: A: 种子诱导 40 天; B: 愈伤组织继代培养; C: 愈伤组织分化出芽; D: 愈伤组织分化出苗
 Figure 2 The process of generation *Tos17* insertioanl lines
 Note: A: Calli were produced on mature seeds; B: Calli subculture; C: Shoots were produced from calli; D: Seedling generation

1.3 突变体库中*Tos17*插入位点数分析

为了评估插入突变体库中*Tos17*转座的位点数, 随机从突变体库中选取了T₀代再生植株200份, 采用Southern杂交的方法检测再生植株中*Tos17*的拷贝数。部分植株的Southern杂交结果如图3所示, 箭头所示的泳带为中花11号的原始拷贝, 检测的再生植株中均含有新的*Tos17*转座拷贝。统计检测的200份样品中总共含有*Tos17* 新拷贝280个, 平均每个T₀代再生植株中含有1.4个新的*Tos17*插入拷贝, 据此推测本突变体库中含有的新的*Tos17*拷贝数约为21760个。

1.4 侧翼序列的分离

接头 PCR(Adapter-PCR)的一种非常有效的分离侧翼序列的方法(Piffanelli et al., 2007), 通过设计合适的限制性内切酶, 连上特异接头, 通过两步巢式 PCR

反应, 可以获得 60%以上植株的 *Tos17* 插入位点的侧翼序列(图 4)。由于我们所用的 *Tos17* 左右端特异引物据左右边界都超过 200bp, 因此 Adapter-PCR 产物经 1%TBE 凝胶电泳后, 回收片段大小在 200 bp 以上的片段送往上海国家基因研究中心测序, 小于 200 bp 的片段由于序列太短没有被回收。

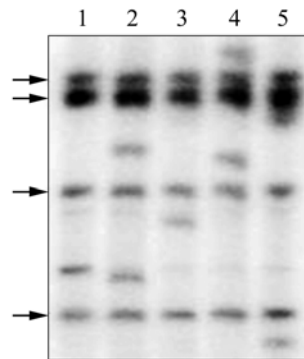


图3. 突变体库中*Tos17*插入拷贝数检测
 注: 箭头所示为水稻品种中花11号原始拷贝; Line 1-5, T₀代再生植株
 Figure 3 The examination of *Tos17* copy number in the regeneration plants
 Note: A: Arrows indicate the native copies in Zhonghua11; Line 1-5 indicates the regeneration plants

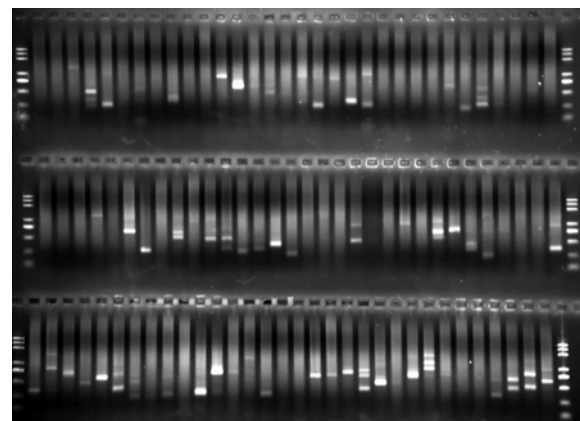


图4. *Tos17* 侧翼基因组序列的扩增
 注: 两侧为DNA Marker(5000bp, 3000bp, 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp); 中间泳道为接头PCR电泳扩增结果
 Figure 4 Amplification of the flanking sequence of *Tos17* in regenerated plants
 Note: The side lines indicate the Tran2K plus DNA Marker (5000bp, 3000bp, 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp); The middle lines indicate the PCR amplified products by Adapter-PCR method

1.5 侧翼序列分析

根据 TIGR 的数据我们将水稻基因组简单的划分为三个区域: 基因区(Genic region), 基因间隔区(Intergenic region), 转座因子相关区(TE-related region)。依据对基因功能产生影响的直接区域, 将基因区界定为基因编码区, ATG 上游 1kb 和翻译终止密码子下游 500bp(Zhang et al., 2007)。卡方检测结果证明 *Tos17* 在基因区、基因间隔区和转座子相关区的分布是不均匀的($\chi^2=210, P<0.005$)。从 SR 值的计算结果来看, *Tos17* 在基因区内的插入数目要显著高于期望值(SR=10.85), 而在转座因子相关区(-3.68)和基因间隔区(-8.88)要显著少于期望值(表 3)。我们初步认为 *Tos17* 极度偏向插入基因的编码区而不偏向于插入基因的间隔区和转座因子相关区。

我们将基因区初步划分为编码区, ATG 上游 1kb 区和翻译终止密码子下游 500bp。同样通过卡

方检测证明 *Tos17* 的插入具有显著的偏爱性($\chi^2=52.58, P<0.005$)。SR 值证明 *Tos17* 在基因编码区的插入要显著的高于期望值, 而在 ATG 上游 1kb 区和翻译终止密码子下游 500bp 这两个区内要显著少于期望值, 初步证明 *Tos17* 偏爱插入基因区(SR=4.55)而不偏向插入 ATG 上游 1kb 区(SR=-4.62)和翻译终止密码子下游 500bp(SR=-3.25)这两个区。而基因的编码区又可以细分为外显子(Exon)和内含子(Intron)这两个区域。卡方测验($\chi^2=11.4, P<0.005$)证明 *Tos17* 插入数目在编码区内的分布也不是一个平均的状态, 而且存在显著差异。通过 SR 分析发现 *Tos17* 在外显子内的插入数目要显著高于期望值(SR=2.48), 而在内含子内的插入虽然少于期望值但是没有达到显著水平(SR=-2.29)(表 1)。因此我们初步认为 *Tos17* 在基因编码区内显著偏爱插入基因的外显子区域。

表1. 524条*Tos17*标签在水稻基因组中各区间内的分布(以SR值>2.33为显著水平)

Table 1 Distribution of the 524 *Tos17* insertions in different regions of the rice genome.

比较组	区域	插入标签数	期望值	标准差	区段大小
Test	Region	Number of insertion	Expected	SR	Chromosome size (Mb)
1	Genic	389	226	10.85	160.4
	TE-related	55	90	-3.68	63.8
	Intergenic	80	208	-8.88	147.8
2	Coding	344	269	4.55	36.6
	1kb upstream	66	116	-4.62	58.7
	500bp downstream	34	59	-3.25	60.4
3	Intron	154	185	-2.29	37.6
	Exon	190	159	2.48	35.5

1.6 *Tos17*插入突变体的筛选

为了检测 *Tos17* 插入导致植株突变的效率, 我们对 1,881 个 T_1 代家系进行了突变表型的观察, 每一个家系至少种植 20 株, 理论上二倍体物种中如果一个染色体上含有一个 *Tos17* 插入拷贝, 根据孟德尔遗传分离比后代应该出现 1:2:1 的基因型分离, 纯合突变体应该占到观察植株数的 1/4。在水稻正常栽培条件下, 我们在苗期、分蘖期、抽穗期、成熟期考察了植株产生的变异, 其中对育性、分蘖数、抽穗期和穗型进行了重点观察。

在苗期出现的最多表型为白化和黄化, 共观察到白化突变体家系12个, 占突变家系的11.0%, 突变频率为0.64%。出现黄化表型家系9个, 占突变家系的

8.26%, 突变频率为0.48%。而移栽后, 共计88个家系出现突变表型, 突变频率为4.67%, 其中最主要的突变表型为矮化, 共观察到42个家系, 占突变家系的38.53%, 突变频率为2.23%。以晚抽穗15天为界限, 共计观察到晚抽穗家系9个, 占总突变家系的8.26%, 突变频率为0.48%, 其中一个家系“08Z11AD56”晚抽穗20天。苗期和移栽后共计观察到突变家系109个, 突变频率为5.79%。所有突变类型及突变频率如表2所示, 图5为部分典型突变体照片。

1.7 *Tos17*插入位点的验证

插入标签法分离克隆功能基因首先要证实插入标签与突变体表型共分离。由于 *Tos17* 插入位点的侧翼基因组序列是通过 PCR 扩增得到的, 在批量化收

集样品、回收扩增片段及引物特异性方面往往导致侧翼序列与水稻基因组序列匹配性地, 少数序列与植株样品不对应。为了验证本研究获得的侧翼序列的正确性, 我们通过设计一条和插入位点附近的基因组序列

特异匹配的引物与 *Tos17* 边界的特异的引物匹配对样品进行 PCR 扩增, 如果目的位点确实存在 *Tos17* 的插入, 那么就会扩增出预期大小的目的条带(图 6A), 从而初步证实 *Tos17* 在该植株中的插入位点。

表 2. *Tos17* 突变表型和突变频率

Table 2 Summary of *Tos17* insertional mutant phenotypes in T₁ families

突变表型	突变家系数	突变频率
Mutant phenotype	Mutant serial No	Mutant frequency
矮化 Dwarf	42	2.23%
不育 Sterility	22	1.17%
白化 Albino	12	0.64%
晚抽穗 Late heading date	9	0.47%
黄化 Yellow leaf	9	0.47%
穗退化 Degenerated panicle	5	0.26%
米粒短圆 Short grain	2	0.11%
分蘖角度变大 Large tiller angle	2	0.11%
分蘖减少 Less tillers	2	0.11%
棒状穗 Malformed panicle	2	0.11%
叶片卷缩 Curled leaf	1	0.05%
短穗 Short panicle	1	0.05%

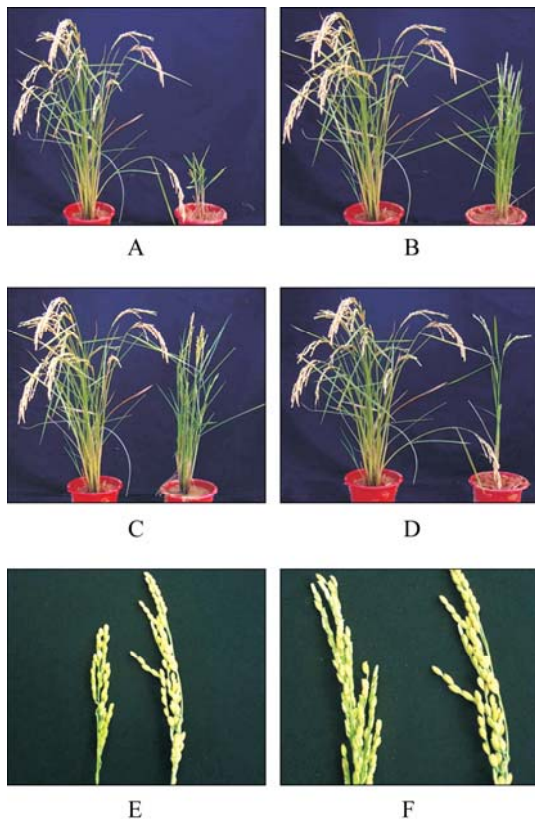


图 5. 部分突变体表型

注: A: 矮化; B: 穗退化; C: 不育; D: 单分蘖; E: 穗短小; F: 外稃退化

Figure 5 Examples of mutant phenotypes

Note: A: Dwarf; B: Degenerated panicle; C: Sterility; D, Uniculm; E: Short panicle; F: Malformed glumes

选取已有 *Tos17* 的侧翼序列的 10 个家系共 12 个插入位点进行了检测, 其中有 10 的插入位点证实是正确的, *Tos17* 在不同家系中的插入位点如表 3 所示。图 6B 为其中一个家系 08Z11AO40 PCR 扩增片段的电泳胶图。在 08Z11AO40 中, *Tos17* 插在第 6 染色体的一个基因 LOC_Os06g09430 内, 在插入位点 Chr6: 4787186 上下游各选取 1 Kb, 设计基因特异引物 AO40R (5' AGGAGGGCAGGAA GTGA 3'), 和 *Tos17* 特异引物 TRB1 配对进行 PCR 扩增。在 08Z11AO 40 家系的 T₁ 代 7 个单株中, 有 5 个单株扩增出了 500bp 左右的预期条带, 说明这 5 个单株在该位点含有 *Tos17* 标签; 另外 2 株没有扩增出预期条带, 说明它们是在 T₁ 代中分离出的该位点野生型基因型。

表 3. *Tos17* 插入位点和检测结果

Table 3 Examination of the *Tos17* insertional site in different lines

家系名称	插入位点	插入方向	验证引物	结果
Accession No.	Insertion site	Orientation	Primers	Result
08Z11AF4	Chr3: 26985271	正向 Forward	TRB1+AF4R	正确 Correct
08Z11AF90	Chr3: 25579090	反向 Reverse	TRB1+AF90R	错误 Fault
08Z11AF91	Chr3: 9518768	正向 Forward	TRB1+AF91R	正确 Correct
	Chr3: 9538658	正向 Forward	TRB1+AF91BRR	正确 Correct
08Z11AF92	Chr1: 35432225	反向 Reverse	TRB1+AF92R	正确 Correct
08Z11AD56	Chr9:22509508	正向 Forward	TRB1+AD56R	正确 Correct
08Z11AH77	Chr10:16761328	反向 Reverse	TRB1+AH77R	正确 Correct
	Chr1:39289229	正向 Forward	TRB1+AH77BR	错误 Fault
08Z11AO40	Chr6:4787186	正向 Forward	TRB1+AO40R	正确 Correct
08Z11AO41	Chr3:35554918	反向 Reverse	TRB1+AO41R	正确 Correct
08Z11AM31	Chr4:22402453	反向 Reverse	TRB1+AM31R	正确 Correct
08Z11AM86	Chr4: 20551763	正向 Forward	TRB1+AM86R	正确 correct

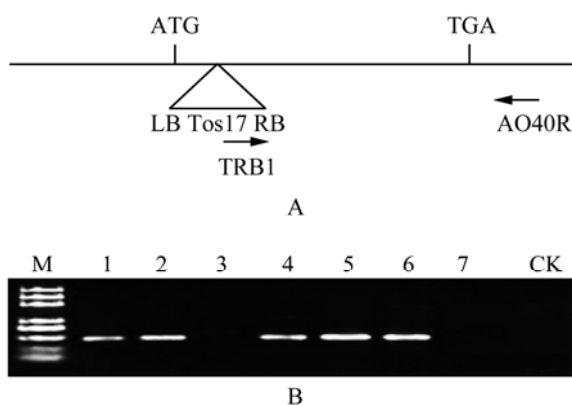


图 6 *Tos17* 在基因 LOC_Os06g09430 中的插入位点以及 PCR 验证结果

注: A: *Tos17* 插入位点示意图; B: PCR 扩增验证结果, 左边泳道为 DNA Marker (5000bp, 3000bp, 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp); 泳道 1-7 为家系 08Z11AO40 的 T1 代植株 *Tos17* 在基因 LOC_Os06g09430 位点的检测结果 (配对引物为 TRB1 和 AO40R), CK, 中花 11 号作为阴性对照

Figure 6 Verification of the insertion of *Tos17* on the gene LOC_Os06g09430

Note: A: Insertion site of *Tos17* on the gene LOC_Os06g09430; B: Left line indicates the Tran2K plus DNA Marker (5000bp, 3000bp, 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp); Line 1-7 indicate the result of PCR amplification of the progeny of

08Z11AO40 with the primers of TRB1 and AO40R, CK indicate the negative control with Zhonghua 11 sample

2 讨论

接头 PCR 由于涉及酶切连接的过程, 因此对于模板 DNA 的质量有很高的要求, 同时对于限制性内切酶的选择很重要。由于在水稻基因组中存在 *Tos17* 的原始拷贝, 因此接头 PCR 的体系和设计需要满足不能将原始拷贝附近的基因组序列扩出的要求。对于水稻品种“日本晴”, 两个原始拷贝附近的基因组序列酶切位点分析表明, *DraI* 更适合分离 *Tos17* 侧翼序列, 因为“日本晴”中的两个 *Tos17* 原始拷贝的右端的 *DraI* 酶切位点距这两个 *Tos17* 原始拷贝的右端边界的距离都在 1.8kb 以上, 而所用的接头 PCR 中进行巢式 PCR 扩增的反应程序很难将 2kb 以上的片段扩出, 这样分离出的 *Tos17* 侧翼序列即为新插入位点的侧翼序列。对于中花 11 号, 经过摸索我们认为 *XbaI* 和 *DraI* 这两种酶比较适合用于进行接头 PCR 反应。同样我们还在据 *Tos17* 左边界 200bp 左右设计了从 *Tos17* 左端进行巢式 PCR 扩增的 *Tos17* 特异引物, 从而比较从不同方向分离 *Tos17* 侧翼序列的效率。实验证明, 从 *Tos17* 右端分离侧翼序列 PCR 扩增效率可以达到 60% 以上,

测序效率更是可以达到 90%，而从左端分离 *Tos17* 侧翼序列往往存在原始拷贝的公共带，影响侧翼序列的分离效率。

我们总共获得到非重复的 *Tos17* 侧翼序列 524 条，通过分析发现 *Tos17* 的插入位点覆盖在水稻整个基因组上。就 *Tos17* 在基因区间的分布而言，*Tos17* 倾向于插入基因区间内，不倾向于插入到基因间隔区和转座子区域，在基因内则比较倾向于插入基因的编码区，而在基因的编码区内则显著的偏爱于插入基因的外显子区域。这些特征和 *Tos17* 在“日本晴”中的报道相一致(Miyao et al., 2003; Piffanelli et al., 2007)。同时，这些特征在水稻 T-DNA 插入突变体库中也是类似的(Zhang et al., 2007)。

在 2009 年夏季对 1 881 个 T_1 代家系进行了正向遗传学的筛选，希望从正向遗传学的途径筛选到与 *Tos17* 共分离的突变家系。从筛选的结果来看，田间最主要的突变表型是矮化，突变频率达到 2.23%，占总突变家系的 38.53%，其次是育性，不育突变频率达到 1.17%，占总突变家系的 20.56%。这和日本 NIAS 研究所的筛选结果基本一致，其筛选的 M_2 代家系中主要的表型也是矮化和不育(Miyao et al., 2007)。而且从田间的表型来看，突变往往不是只有个性状，存在两个或三个突变性状同时发生的现象，例如矮化往往伴随不育或抽穗期的延迟，叶色变化与株高和穗部突变往往联系在一起，这说明被插入的基因可能具有一因多效或是有多个基因被同时敲除掉。从筛选的整个结果来看，1 881 个家系中表型突变频率为 5.69%。而 NIAS 研究所对其 *Tos17* 突变体进行了表型筛选，发现后代几乎一半的家系出现了至少一个突变表型。其突变频率要高于我们的观察结果。其原因可能是：NIAS 研究所构建的 *Tos17* 突变体每株中 *Tos17* 的平均拷贝数达到 10 个(Miyao et al., 2007)，远远高于本室 *Tos17* 突变体中的平均拷贝数。

Krysan 等于 1999 年提出了的公式： $P = 1 - (1 - x/g)^n$ ，已被广泛用于计算构建饱和突变体库所需的标签数目。公式中 X 代表目标作物基因的平均大小，G 代表目标作物基因组的大小，n 代表以一定概率 P 饱和基因组所需的标签数目。以水稻基因组大小为 372,000 Kb，基因的平均长度为 2.8 Kb 来计算，预计是水稻每一个基因含有标签的概率 99%需要得到 561,677 条标签序列。目前在水稻中的突变体资源已经超过 2 000 000，侧翼序列的数目也超过

了 200,000。那么由此产生了一个问题，到底需要多少标签能够饱和掉水稻的基因组，即任何一个基因有 99%的概率能至少找到一个标签。目前水稻中的突变体库资源中的插入位点已经超过 2 000 000 已经远远满足饱和水稻基因组的要求，但是水稻中侧翼序列的数目仅有 200 000 条左右，远远低于饱和水稻基因组的要求，因此目前比较迫切的任务是采用更有效的方法分离更多的侧翼序列。新一代测序技术的出现和发展可能会是给这一难题提供解决方法(Mardis, 2008)。随着测序成本的降低和测序效率的提升，未来希望能够通过深度测序或其他方法高效地鉴定标签的插入位点，实现高效剖析水稻全基因组中功能基因的目的。

3 材料和方法

3.1 *Tos17*突变体的产生

将脱壳的野生型中花 11 号种子，于 75%酒精中消毒 15min，10% $HgCl_2$ 消毒 30min，转移到诱导培养基中。待 30 天后愈伤长出，为防止产生的后代 *Tos17* 突变体之间有相同的突变位点，所以每一颗种子诱导出的愈伤仅取一颗转移到继代 N_6 培养基中(Wu et al., 2003)，每 30 天更换培养基一次，继代培养 3 个月。将经过 3 个月继代培养的愈伤转移到分化培养基中，分化产生 T_0 代突变植株。每一个愈伤上诱导出的植株只取一株，夏季种于武汉华中农业大学试验田。

3.2 T_1 代突变体的筛选

2009 年 4 月在华中农业大学实验田播种 *Tos17* 突变体 T_1 代家系 1,883 个，5 月 20 日将每个家系随机取 20 株以 16.5cm×26.4cm 的密度移栽大田，于分苗期、分蘖期、抽穗期和成熟期四个时期观察表型。对家系内突变体表型一致的家系进行记载、拍照。

3.3 DNA抽提和接头PCR分离侧翼序列

取水稻新鲜幼嫩片，在-20℃预冷的研钵中磨至粉末状转入预冷的 2ml 离心管中，加入约半管。每管加入 600 μ L 2% CTAB 混合液(2% CTAB、1.4mM NaCl、20mM EDTA、100mM Tris-HCl、15 μ L RNA 酶、0.2% β -巯基乙醇)，上下颠倒摇匀，于 65℃水浴锅中水浴 15min，11,000rpm 离心 5min，吸取上清约 500 μ L。加入等体积的氯仿：异戊醇(24:1)，上下颠倒轻摇 5min。11,000rpm 离心 5min，吸上清 400 μ L。加入异丙醇 400 μ L，上下颠倒轻摇沉淀 DNA。离心 5000rpm，30sec 沉淀 DNA，丢弃上清。

加入 500 μ L 75%乙醇, 洗沉淀, 离心 10sec, 弃上清, 自然风干, DNA 沉淀溶于 50 μ L 无菌水中。

本研究采用接头 PCR 的方法分离侧翼序列, 所用引物见表 4。接头(AD)制备方法: 等体积混合引物 AD-L (100mM)和引物 AD-S (100mM), 最终反应浓度为 50mM, 在 95%水浴锅中水浴 10min, 自然冷却至室温。具体的反应步骤和反应程序如下: 第一步: 模板 DNA 的酶切和连接。体系: 取用分离侧翼序列用 CTAB 法分离的模板 DNA 样品 1 μ L, 接头(50mM) 0.2 μ L, 10 \times M buffer 1 μ L, 10 \times T₄ DNA 连接酶 buffer 1 μ L, DraI (15U/ μ L) 0.15 μ L, T₄ DNA 连接酶(10U/ μ L) 0.2 μ L, 补 ddH₂O 水到 10 μ L。反应置于 25 $^{\circ}$ C(室温)反应约 16-20h。

第二步: PCR 反应第一步。第一步反应产物 1 μ L, 10 \times PCR buffer 2 μ L, 2mM dNTPs 1.8 μ L,

25mM MgCl₂ 1.3 μ L, ADS-1(50mM) 0.5 μ L, 3'端或 5'端特异引物(TRB1 或 TosLP1), rTaq DNA polymerase(Takara 公司) 0.2 μ L, 补充 ddH₂O 到 20 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 4min; 94 $^{\circ}$ C 30sec, 72 $^{\circ}$ C 3min, 7cycles; 94 $^{\circ}$ C 30sec, 67 $^{\circ}$ C 3min, 32cycles; 67 $^{\circ}$ C 7min; 25 $^{\circ}$ C 10sec。

第三步: PCR 反应第二步。第一步 PCR 反应产物 1 μ L, 10 \times PCR buffer 2 μ L, 2mM dNTPs 1.8 μ L, 25mM MgCl₂ 1.2 μ L, ADS-2(50mM) 0.5 μ L, 3'端或 5'端特异引物(TRB2 或 TosLP2), rTaq DNA polymerase(Takara 公司) 0.2 μ L, 补充 ddH₂O 到 20 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 4min; 94 $^{\circ}$ C 30sec, 72 $^{\circ}$ C 3min, 5cycles; 94 $^{\circ}$ C 30sec, 67 $^{\circ}$ C 3min, 35cycles; 67 $^{\circ}$ C 7min; 25 $^{\circ}$ C 10sec。

表 4. 接头 PCR 所用引物

Table 4 The primers used for Adaptor-PCR

引物名称 Primer	用途 Purpose	序列 (5'-3') Sequence
AD-L	接头 Adaptor	CTAATACGAGTCACTATAGCGCTCGAGCGGCCCGGGGAGGT
AD-S	接头 Adaptor	P-ACCTCCCC-NH ₂
ADS-1	接头特异引物 Specific primer for adaptor	GGATCCTAATACGAGTCACTATAGCGC
ADS-2	接头特异引物 Specific primer for adaptor	CTATAGCGCTCGAGCGGC
TosLP1	<i>Tos17</i> 左端引物 Left primer	GTGAAAAGGACAGTGGAGCAGTGGATAA
TosLP2	<i>Tos17</i> 左端引物 Left primer	GACCATTGCTCTGATACCATCTTAACTAACTTGC
TRB1	<i>Tos17</i> 右端引物 Right primer	GCATCTTTCACACGTTCTCATTGTGTCAG
TRB2	<i>Tos17</i> 右端引物 Right primer	CGGTTACATCTTCTCAAACCTCAATGTG

3.4 Southern杂交

抽提的水稻样品 DNA 5 μ g, 采用限制性内切酶 *Xba*I 完全酶切, 用 1%TAE 凝胶电泳, 然后转移到尼龙膜上(Zhang et al., 2007)。PCR 反应扩增 *Tos17* 探针的引物为: TosL: 5'-GCT

ACCCGTTCTTG GACTAT-3' ; TosR : 5'-CTGAAATCGGAGCACTGACA-3'; 探针合成 PCR 反应体系: 野生型中花 11 号样品 DNA 5ng, 10 \times PCR Buffer 2 μ L, 2mmol/L dNTP 1.5 μ L, 10 μ mol/L 引物 0.3 μ L, 10U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L。PCR 反

应程序: 94°C 5min; 94°C 45sec, 55°C 45sec, 72°C, 1min, 30cycles; 72°C, 7min; 25°C 30sec。探针长度为 600bp。

3.5 T₁代共分离检测

根据侧翼序列的信息在水稻生物信息网站 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)上检索, 确定 *Tos17* 插入的位点, 根据插入位点附近的侧翼序列信息, 利用 Premier 5 设计引物, 通过 PCR 反应验证插入位点是否正确。在插入位点两端设计特异引物, 通过一条能和插入位点附近基因组特异匹配的引物

以及一条能和 *Tos17* 特异匹配的引物配对扩增来确定插入位点是否正确。如果能配对扩增出特异性条带, 则证明插入位点正确。PCR 反应在 ABI9700PCR 仪(Applied Biosystem)上进行, 反应体系如下: 模板 DNA 5ng, 10×PCR Buffer 2μL, 2mmol/L dNTP 1.5μL, 10μmol/L 引物 0.3μL, 10U/μL Taq 酶 0.2μL。PCR 反应程序: 94°C 5min; 94°C 45sec, 55°C 45sec, 72°C 1min, 30cycles; 72°C, 7min; 25°C 30sec; *Tos17* 插入位点两侧设计的 PCR 引物如表 5 所示。

表 5. *Tos17* 插入位点两侧设计的 PCR 引物

Table 5 The PCR primers flanking *Tos17* insertion site

引物名称 Primer	序列 (5'-3') Sequence	引物名称 Primer	序列 (5'-3') Sequence
AD56L	TACTGTCCCAAATCCAAA	AH77L	GAATAAGGGCAGCGAATG
AD56R	CAACACCAAAGCATATTCCA	AH77R	GGCAAGAATAATAGACGAAATAC
AF4L	GCAAGGTTTATCTGAGTTCC	AH77BL	TGGCTAACGACTTTCCTCA
AF4R	GCAGTTGTGGCAGGTGT	AH77BR	GAATCACGACATTTCTCCCT
AF90L	GTTTCAGTTCTATCCAAAATCCC	AM32L	GTTGATGATTTGCTTTGTGC
AF90R	AAGACGACAGGAATGGCTC	AM32R	CTGTGCGTGGATGCTGTA
AF91L	CACCTTCAGACGCAAAAACA	AM86L	CTCTTATGCGGAAGTATGGC
AF91R	GCCGAACAAACAGAAACG	AM86R	TGGGGATTTCCGGTTG
AF91BL	GTTTCGACTGCGTCTTC	AO40L	GTGGGAATGTGAAATACGG
AF91BR	TCAATCCACTGCTTGCTTAC	AO40R	AGGAGGGCAGGAAGTGA
AF92L	GTCGTTTTAGGCGTGGCT	AO41L	GAGGTTGGGCTGCTGTT
AF92R	CGTTTTGGAGTCCGTGTT	AO41R	GGATTGTAGATCGGATGAGTAA

作者贡献

本研究是在吴昌银的指导下完成的。马振参与了突变体的创建过程, 完成数据分析, 论文初稿的写作; 突变的田间种植、收种主要由陈国兴完成; 吴昌银设计并组织完成了该项研究, 论文修改。全体作者都阅读并同意论文的文本投稿。

致谢

本研究由国家863计划项目(2006AA10A103)资助及国家转基因重大专项课题(2008ZX08010-002)资助。作者感谢李才顺、章成君、曹娟、陈玲、郜新强等人的帮助。

参考文献

Cheng C., Daigen M., and Hirochika H., 2006, Epigenetic regulation of the rice retrotransposon *Tos17*. *Mol Genet*

Genomics, 276: 378-390

Hirochika H., Guiderdoni E., An G., Hsing Y I., Eun M Y., Han C D., Upadhyaya N., Ramachandran S., Zhang Q., Pereira A., Sundaresan V., and Leung H., 2004, Rice mutant resources for gene discovery. *Plant Mol Biol*, 54:325-334

Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y., Tsugawa H., and Kanda M.,1996, Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 7783-7788

Jeon J S., Lee S., Jung K H., Jun S H., Jeong D H., Lee J., Kim C., Jang S., Yang K., Nam J., An K., Han M J., Sung R J., Choi H S., Yu J H., Choi J H., Cho S Y., Cha S S., Kim S I., and An G., 2000, T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J*, 22: 561-570

- Krishnan A., Guiderdoni E., An G., Hsing Y I., Han C D., Lee M C., Yu S M., Upadhyaya N., Ramachandran S., Zhang Q., Sundaresan V., Hirochika H., Leung H., and Pereira A., 2009, Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses. *Plant Physiol*, 149: 165-170
- Krysan P J., Young J C., and Sussman M R., 1999, T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis. *Plant Cell*, 11: 2283-2290
- Mardis E R., 2008, The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*, 24: 133-141
- Martienssen RA., 1998, Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 2021-2026
- Miyao A., Iwasaki Y., Kitano H., Itoh J., Maekawa M., Murata K., Yatou O., Nagato Y., and Hirochika H., 2007, A large-scale collection of phenotypic data describing an insertional mutant population to facilitate functional analysis of rice genes. *Plant Mol Biol*, 63: 625-635
- Miyao A., Tanaka K., Murata K., Sawaki H., Takeda S., Abe K., Shinozuka Y., Onosato K., and Hirochika H., 2003, Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell*, 15: 1771-1780
- Nonomura K., Nakano M., Fukuda T., Eiguchi M., Miyao A., Hirochika H., and Kurata N., 2004a, The novel gene HOMOLOGOUS PAIRING ABERRATION IN RICE MEIOSIS1 of rice encodes a putative coiled-coil protein required for homologous chromosome pairing in meiosis. *Plant Cell*, 16: 1008-1020
- Nonomura K I., Nakano M., Murata K., Miyoshi K., Eiguchi M., Miyao A., Hirochika H., and Kurata N., 2004b, An insertional mutation in the rice *PAIR2* gene, the ortholog of Arabidopsis *ASY1*, results in a defect in homologous chromosome pairing during meiosis. *Mol Genet Genomics*, 271: 121-129
- Piffanelli P., Droc G., Mieulet D., Lanau N., Bes M., Bourgeois E., Rouviere C., Gavory F., Cruaud C., Ghesquiere A., and Guiderdoni E., 2007, Large-scale characterization of *Tos17* insertion sites in a rice T-DNA mutant library. *Plant Mol Biol*, 65: 587-601
- Wu C., Li X., Yuan W., Chen G., Kilian A., Li J., Xu C., Li X., Zhou D X., Wang S., and Zhang Q., 2003, Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *Plant J*, 35: 418-427
- Zhang J., Guo D., Chang Y., You C., Li X., Dai X., Weng Q., Zhang J., Chen G., Li X., Liu H., Han B., Zhang Q., and Wu C., 2007, Non-random distribution of T-DNA insertions at various levels of the genome hierarchy as revealed by analyzing 13804 T-DNA flanking sequences from an enhancer-trap mutant library. *Plant J*, 49: 947-959



《分子植物育种》是一份为转基因育种、分子标记辅助育种及常规育种服务的科学杂志，也是中国唯一的一份以育种为名的科学杂志。于2003年创刊，创刊伊始即被美国化学文摘(CA)，中国科学引文数据库、中国科技期刊全文数据库、中国引文数据库，中国科技期刊数据库、中文科技期刊数据库，中国核心期刊(遴选)数据库，中国生物学文摘和中国生物学数据库等多家中外文献数据库收录。



在线投稿: <http://mpb.chinese.sophiapublisher.com>



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文，任何人都可以免费在线阅读您的论文

- ※同行评审，论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表，论文一经接受，即刻在线发表
- ※开放取阅，任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索，涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权，作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>