

水稻转座子突变体库的构建及突变类型的遗传分析

朱正歌¹ 肖 晗¹ 傅亚萍¹ 胡国成¹ 于永红¹
斯华敏¹ 张景六² 孙宗修^{1*}

¹(中国水稻研究所,农业部水稻生物学重点实验室 杭州 310006)

²(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘 要 利用根癌农杆菌介导的遗传转化法,把玉米转座子 Ac 片段(合成转座酶)和 Ds 因子(转座序列)分别导入粳稻品种中花 11,获得了 400 多个转化株系。有 63 个株系的转基因 T₀ 代植株或 T₁ 代植株出现了可见的形态变异,包括抗病、白苗、黄苗、白条斑叶、有色秆、矮秆、匍匐茎、雄性不育、抽穗早、抽穗迟、多倍体等突变类型。对突变性状的形态及分子生物学分析,有些突变类型可能与转座子插入有关。

关键词 转座子 突变体 聚合酶链式反应 Southern 杂交 随机扩增多态 DNA

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0288-05

随着水稻基因组计划的顺利进行,基因组巨著的问世,发现新基因或发现基因的新功能已成为功能基因组学研究的最重要任务。突变体是研究功能基因组的前提,任何基因的和定位都离不开突变体,突变可以自发产生,也可以通过人工诱变产生。但是自发突变的频率很低,而人工诱变可明显提高突变频率。尤其是插入突变、转座突变等生物学方法进行的诱变近年来在分离与克隆基因方面取得重大突破。把玉米的转座子引入水稻,构建水稻转座子突变体库,通过转座子在染色体上的不断跳跃来获得一系列的突变体,利用一个群体研究多个基因的功能,对水稻基因组的研究有非常重要的意义。日本学者 Hiroyuki Enoki^[1]、Izawa^[2]、Shimamoto^[3]等证明玉米转座子 Ac 在水稻中的活性已超过 3 代;Chin HG^[4]、Narayana U^[5]、Raffae G^[6]和 Hyun P^[7]等学者均进行了有关研究,取得了一致的结果,表明 Ac/Ds 在水稻中的转座活性是不容置疑的。我们把玉米转座子 Ac/Ds 导入粳稻中花 11,在转化株系 T₀ 或 T₁ 中出现了一些突变体,初步的实验结果也表明,有些突变可能与转座子插入有关。Ac/Ds 的杂交种子正在繁殖,转座子的再次切离或插入又会出现新的突变性状。由此可见,通过转座子插入突变构建水稻突变体库,进行功能基因组学研究是可行的。

1 材料与方法

1.1 材料

粳稻中花 11(*Oryza sativa* L. subsp. japonica.) 质粒 pDsBar1300H* (含 Ds 因子)和 pUBITs(含 Ac 片段)(由中科院上海植物生理所提供),农杆菌菌株 EHA105 由 Jefferson 博士提供。

1.2 农杆菌介导的水稻的遗传转化

利用本实验室优化的高效的农杆菌介导的水稻遗传转化方法^[8],把玉米转座子 Ac 片段、Ds 因子分别导入粳稻品种中花 11,共获得了 23 个转 Ac 片段的独立株系(109 株),387 个转 Ds 因子的独立株系(500 多株)。

1.3 转基因植株的 PCR 和 Southern 检测

1.3.1 转基因植株 DNA 的提取:按卢扬江等^[9]的方法提取水稻叶片 DNA,取幼叶 5g 左右,在液氮冷冻的条件下磨碎,加 20mL 经 65℃ 预热的抽提缓冲液(100mmol/L Tris-HCl pH8.0, 20mmol/L EDTA, 500mmol/L NaCl, 1.5% SDS)预热 40min,加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)于 60r/min 振荡 20min,3500r/min 离心 15min,取上清液,加 0.8 倍体积的异丙醇,钩出 DNA 沉淀。加 TE 溶解,RNA 酶消化,再用 3mol/L 醋酸钠、100% 冷乙醇纯化。制备的 DNA 样

品用于 Southern blotting 和 PCR 分析。

1.3.2 转基因植株的 PCR 扩增 :引物 P_1 5' ACAAT-CTCCGAACCAAGACG 3', P_2 5' CATTGAGCCTATAAG-TACG 3', 对转 Ac 的植株进行 PCR 扩增(95°C/4min; 94°C/30s, 55°C/30s, 72°C/1min, 30 个循环; 72°C/10min 延伸)。引物 P_3 5' GATGAAAACGGTCCGGTA-ACG-GTCG 3', P_4 5' GATGCATGGGCTGTTTGTGTGCG 3', 用于对转 D_s 的植株进行 PCR 扩增(95°C/4min; 95°C/30s, 58°C/30s, 72°C/1min, 30 个循环; 72°C/10min 延伸)。反应体系均按 Sambrook 等^[10]的方法加入, 反应体积为 25 μ L。扩增反应在 PERKIN ELMER-9600PCR 仪上进行, 扩增产物通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 转基因植株的 Southern 检测 :植株 DNA 经 *Eco*RI 限制酶完全酶解, 或经 *Eco*RI 与 *Pst*I 双酶解, 0.8% 琼脂糖凝胶 35V 电压条件下电泳 15h, 用毛细管转移法将胶中的 DNA 片段转移至尼龙膜上。DNA 探针用直接核酸标记和检测系统 ECL(英国 Amersham 公司生产)进行标记。然后把经 Southern 转移的膜于含有 0.5mol/L NaCl 和封闭试剂(5%)的杂交液中预热, 42°C 预杂交 1h, 再加入已标记好的探针, 42°C 杂交过夜。杂交膜用洗液 I(urea 5mol/L; 0.5 \times SSC, pH7.0, 0.4% SDS)于 42°C 洗涤 2 次, 每次 10min, 再用 2 \times SSC 室温下洗涤 2 次, 每次 5min。将等体积检测试剂 I(H_2O_2)和检测试剂 α 鲁米诺及增强剂)混合, 倒于膜上, 反应 1min。X 光片上曝光

0.5~2h, 常规方法冲片。

1.4 突变植株的形态分析

对转基因植株(T_0)中出现的突变类型进行田间观察和统计, 对所有突变类型的植株进行套袋自交。 T_1 代按株系种植, 目测发现突变株并做统计分析。157 自交后代出现了矮秆变异植株(矮秆编号为 157d, 株高 40~45cm, 正常高秆为 157D, 株高为 100~110cm, 见图 1 左), 且高矮植株的比为 3:1, 157D 自交后代中有的株系全为高秆, 有的株系又呈现明显的 3 高:1 矮的分离, 而 157d 的自交后代全为矮秆变异植株, 这一形态结果表明这一对相对性状由一对等位基因控制。380b 的自交后代出现了雄性不育植株(图 1 右, 不育株编号为 380S, 正常可育植株为 380F); 不育株上的穗子套袋自交不能结实, 不套袋的穗子上会有少量的几粒种子, 估计是外来花粉受精所致。初步检测表明该雄性不育为花粉败育, 目前正在寻找与败育相关的基因。

1.5 突变植株的 RAPD 检测

对 157 和 380b 进行 RAPD 分析, 按 BSA 法构建基因池, 目的是寻找与突变性状相关的标记。采用 Sangon 公司生产的随机引物 S_1 - S_{100} , S_{201} - S_{260} , 反应条件为 95°C/4min; 94°C/1min-36°C/min-72°C/1min; 35 个循环, 72°C/10min 延伸。反应体系按 Clark M S^[11]的方法加入, 反应体积为 25 μ L, 扩增产物通过 1.4% 琼脂糖电泳检测。

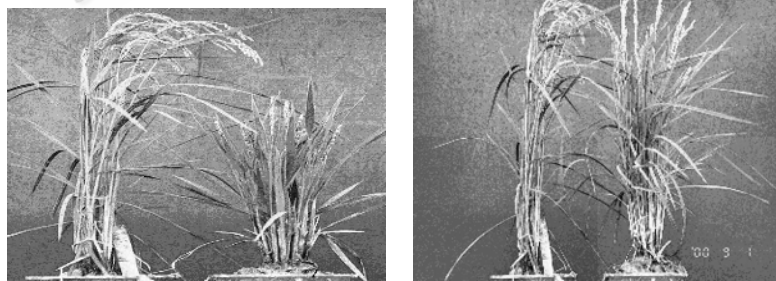


图 1 转基因水稻的突变植株 380F、157D、正常植株 380S、雄性不育植株 157d、矮秆植株

Fig.1 Transgenic rice mutant 380F, 157D; normal 380S; male sterile 157d; dwarf mutant

2 结果与分析

2.1 T_0 及 T_1 植株的突变类型统计分析

质粒 pDsBar1300H* 除了含有 D_s 片段外, 还有 Bar 基因与之紧密连锁, 因此, 可通过植株对 Basta 的抗性检测来初步判断 D_s 的插入情况, 对转基因 T_0 植株的叶片涂 0.1% Basta, 结果表明 94.4% 的 T_0 植株具 Basta 抗性。对 279 个 T_1 株系苗期喷洒 0.1% Basta, 抗性出现分离, 其中 201 株系符合 3:1,

23 株系符合 15:1, 55 株系为其它类型。

T_0 植株中发现了有色秆(1株)、白条斑(1株)、矮秆(2株)、雄性不育(1株)、多倍体(1株)等突变类型。考察了 302 个 T_1 代株系, 发现突变性状发生明显分离的株系 63 个, 约占观测总株系数的 21%。分离出的突变体有抗纹枯病、育性差、雄性不育、抽穗早、抽穗迟、高秆矮分离、匍匐茎、黄苗、有色秆、白条斑叶等; 其中不少呈典型的一对基因的分离模式。在 T_1 代出现的突变性状中, 有一些则呈典型的显性

基因的分离模式,例如转 *Ac* 片段植株 920(参见表 1, *D* 为显性性状, *R* 为隐性性状,表中除显性矮秆变异和幼苗期的统计之外,其它均为喷洒 *Basta* 之后的统计结果)。对有些突变性状的 T_1 自交后代 T_2 的统计分析表明,矮秆显性突变、矮秆隐性突变和黄苗均能稳定遗传,且表现明显的 3:1 分离模式。这一结果表明有些突变性状可能由单基因变异造成(分离比符合 3:1)而且个别性状(1 株系矮秆 157d, 1 株系雄性不育 380b)的形态表现与 *Basta* 抗性共分离。

表 1 突变类型的统计分析

Table 1 Statistical analysis of mutants

Mutant types	Independent lines	Separatie ratio of T_1 generation
Dwarf and more tillers (D)	1	107:29
Dwarf and normal tillers (R)	5	
Dwarf and fewer tillers (R)	1	9:20
Color plant (D)	1	36:3
Chlorosis (R)	3	11:37(one line)
Early heading (R)	13	4:10(one line)
Late heading (R)	3	
Male sterile (R)	3	12:24(one line)
Albino seedling (R)	19	33:100(one line)
Yellow seedling (R)	8	14:40(one line)

2.2 转基因植株的分子检测

PCR 扩增结果表明,23 个转 *Ac* 片段的 T_0 株系中有 19 个株系的 DNA 可扩出 1.6kb 的片段(图 2A)随机选 100 个转 *Ds* 的 T_0 株系进行 PCR 扩增,结果表明凡具 *Basta* 抗性的植株均可扩出 900bp 的 *Ds* 片段(图 2B)。对转 *Ds* 的 T_0 植株的 Southern blotting 检测表明,经 *EcoRI* 单酶切后,可见到不同位点的外源 DNA 的插入,有的为单位点插入,有的为多位点插入(图 3A);经 *EcoRI* 和 *PstI* 双酶切后,可见到完整的外源 DNA 片段的插入(图 3B),这些更进一步证明转座子序列 *Ds* 已插入整合到水稻的染色

体上,对转 *Ds* 株系 T_1 代中的某些突变植株的 Southern blotting 检测证明了转座子序列在水稻基因组内可遗传给子代(图 3A,左起 3、4 为 380F、380S,5、6 为 157D、157d)。通过农杆菌介导的遗传转化法,转座子序列在水稻染色体上多为单位点插入,与 T_1 代植株的 *Basta* 抗性的分离比基本一致。

2.3 突变植株的 RAPD 检测

选 157d(矮秆)和 157D(高秆)各 5 株,各取等量叶片分别混合;选 380S(不育)和 380F(可育)各 5 株,也取等量叶片分别混合,按卢扬江等^[9]的方法提取水稻叶片 DNA。

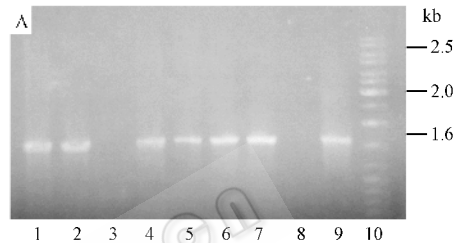


图 2A pUBITs 转化水稻植株的 PCR 鉴定

Fig. 2A Identification of plasmid pUBITs transformed rice plants with PCR amplification
1 ~ 7. Transgenic rice ; 8. CK ;
9. Plasmid ; 10. 1kb ladder

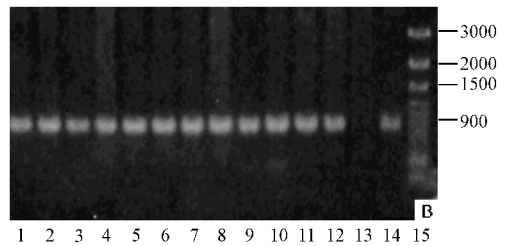


图 2B pDsBar 转化水稻植株的 PCR 鉴定

Fig. 2B Identification of plasmid pDsBar transformed rice plants with PCR amplification
1 ~ 12. Transgenic rice ; 13. CK ; 14. Plasmid ;
15. 100bp ladder

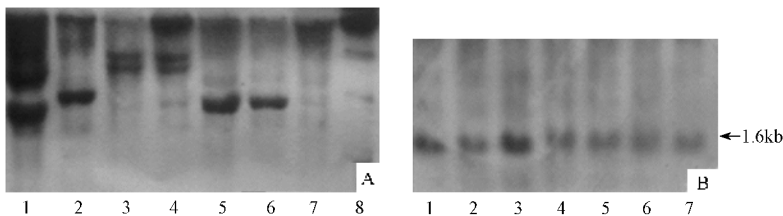


图 3A、B 转基因植株 DNA 的 Southern 杂交

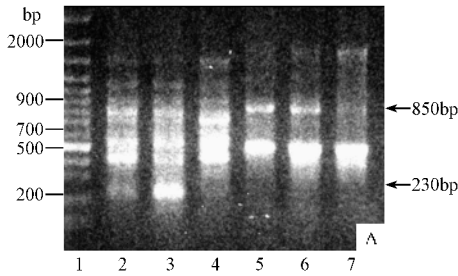
Fig. 3A、B Southern blot analysis of transformants DNA allowed to hybridized with

ECL labeled 900bp *Ds* fragment of pDsBar 1300H⁺

A. DNA was digested with *EcoRI*. 3. 380F ; 4. 380S ; 5. 157D ; 6. 157d ;

B. DNA ws digested with *EcoRI* + *PstI*. 1 ~ 7. Transgenic rice plant

2.3.1 157 矮秆变异植株的 RAPD 检测:对 160 个随机引物进行 PCR 扩增,主要寻找突变池(157d)与正常池[CK 池和 157D 池]的差异,结果表明有 142 个引物能扩出产物,81 个引物可扩出 3 条以上的带,其中有 2 个引物的扩增结果出现差异,且 3 次重复结果一致。S60 的扩增产物中有一条 850bp 的带只在 CK 和 157D 中有,而 157d 没有相应的产物;S67 的扩增产物中有一条 230bp 的带只在 CK 和 157D 中出现,而 157d 没有相应的产物(图 4A,箭头所示)。



2.3.2 380b 雄性不育变异植株的 RAPD 检测:对 160 个随机引物进行 PCR 扩增,主要寻找雄性不育池(380S)与正常池[包括 CK 池和 380F 池]的差异。160 个随机引物中 145 个引物有扩增产物,90 个引物可扩出 3 条以上的带,其中 S79 的扩增产物中有一条 500bp 的带只存在于 380S,而 CK 与 380F 没有相应的产物;S81 的扩增产物中有一条 2.0kb 的带只存在于 CK 与 380F,380S 没有相应的产物(图 4B,箭头所示),且 3 次重复结果一致。

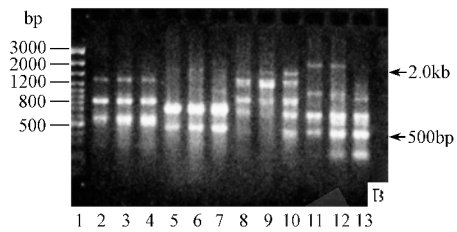


图 4A、B 转基因植株 DNA 的 RAPD 检测

Fig. 4A、B RAPD products of transgenic rice

A. 1. 100bp ladder; 2 5. CK; 3 6. 157D; 4 7. 157d

B. 1. 100bp ladder; 2 5 8 11. CK; 3 6 9 12. 380F; 4 7 10 13. 380S

3 讨 论

利用转座插入突变在分离内源植物(玉米、金鱼草等)基因方面取得了很大成就^[12~15],分离异源植物的基因也取得丰硕成果^[16~19]。通过向水稻基因组内引入玉米的转座子来诱发突变体,从而建立水稻突变体库是一种行之有效的方法。首先,在转化过程中,T-DNA 有可能插入到功能基因组中,引起表型变异;第二,转 Ds 植株与转 Ac 植株杂交的子代,Ds 的不断跳跃又会导致新的变异,从而会得到更多的突变体;第三,转基因过程中的组培阶段会导致许多无性系变异,转座子的跳跃可能会使变异的性状得到恢复;第四,转座插入突变比化学诱变和辐射诱变容易回复;第五,一旦得到由转座子引起的突变,便可以转座子序列为探针,钓出与突变有关的基因。

但是,利用转座子标签法分离基因,必须有足够大的群体,目前国内外学者在这方面的研究没有突破性进展,其主要原因就是获得的独立转化株系较少。另外利用该技术克隆基因也有一定的局限性,一是转座插入突变往往只涉及到单个基因,二是转座插入突变引起的不可目测的生理生化变异往往被忽略,因此提高对生理生化变异的分析,对研究水稻的代谢机制具有重要意义。

致谢 中国水稻研究所庄杰云副研究员、郑康乐研究员在分子生物学检测技术与方法方面给予指导与帮助;AgrEvo 公司叶天勋博士提供除草剂 Basta,谨致谢意。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Enoki H, Izawa T, Kawahara M *et al.* Ac as a tool for the functional genomics of rice. *The plant Journal*, 1999, **19**(5) :605 ~ 613
- [2] Izawa T, Miyazaki C, Yamamoto M *et al.* Transposon tagging in rice. *Plant Mol Biol.*, 1997, **35** :219 ~ 229
- [3] Shimamoto K, Miyazaki C, Hashimoto H *et al.* Trans-activation and stable integration of the maize transposable element Ds co-transfected with Ac transposase gene in transgenic rice plants. *Mol Gen Genet*, 1993, **239** :354 ~ 360
- [4] Chin H G, Choe M S, Lee S H. Molecular analysis of rice plants harboring an Ac/Ds transposable element-mediated gene trapping system. *Plant Journal*, 1999, **19**(5) :615 ~ 623
- [5] Narayana U, Kumar S, Ramm K *et al.* Functional genomics in rice by transposon tagging. *Present at General meeting of the international program on rice biotechnology. Thailand*, 1999
- [6] Raffaella G, Ouwerkerk P, Hoge H *et al.* Functional genomics with transposons in rice. *Present at general meeting of the international program on rice biotechnology. Thailand*, 1999

- [7] Hyun P S , Sook C M , Hyuk K *et al.* Gene trap tagging of a rice gene expressing exclusively at vascular tissues by transposon Ds , *Present at General meeting of the international program on rice biotechnology . Thailand , 1999*
- [8] Xiao Han , Fu Yaping , Zhang Jingliu *et al.* Production of large transgenic rice plants for transposon tagging via *Agrobacterium* . *Sixth International Symposium on Rice Molecular Biology* . 1998 , p. 75
- [9] LU Y (卢扬江) , ZHENG K I (郑康乐) . A simple method for isolation of rice DNA . *Chinese Journal of Rice Science* . 1992 , 1 (1) : 47 ~ 48
- [10] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . *Molecular cloning : a laboratory manual* . Cold Spring Harbor Laboratory Press , USA , 1989 , 1 : 219 ~ 31
- [11] Translation " Plant Molecular Biology-A Laboratory Manual " , edited by Clark M S , translated by GU H Y (顾红雅) and QU L J (瞿礼嘉) . China Higher Education Press Beijing , 1998 , p. 238
- [12] Gai X , Lal S , Xing L *et al.* Gene discovery using the maize genome database ZmDB . *Nucleic Acids Res* 2000 , 28 (1) : 94 ~ 96
- [13] Fedoroff N V , Furtek D B , Nelson O E . Cloning of the bronze locus in maize by a simple and gene realizable procedure using the transposable controlling element activator (Ac) . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1984 , 81 : 3825
- [14] McLaughlin M , Walbot V . 1987 . Cloning of a mutable bz2 allele of maize by transposon tagging and differential hybridization . *Genetics* 117 : 771 ~ 776
- [15] Stiefel V , Becerra E L , Roca R *et al.* TM20 , a gene coding for a new class of transmembrane proteins expressed in the meristematic tissues of maize . *J Biol Chem* . 1992 , 274 (39) : 27734 ~ 27739
- [16] Falk A , Feys B J , Frost L N *et al.* EDS1 , an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases . *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 Mar 16 , 96 (6) : 3292 ~ 3297
- [17] Klimyuk V I , Persello-Cartiaux F , Havaux M *et al.* A Chromodomain Protein Encoded by the *Arabidopsis* CAO gene is a plant-specific component of the chloroplast signal recognition particle pathway that is involved in LHCP targeting . *The Plant Cell* 1999 , 11 (1) : 87 ~ 100
- [18] Fitzmaurice W P , Nguyen L V , Wernsman E A *et al.* Transposon tagging of the sulfur gene of tobacco using engineered maize Ac/Ds elements . *Genetics* , 1999 , 153 (4) : 1919 ~ 1928
- [19] Aarts , Dirkse W , Stiekema *et al.* Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis* . *Nature* , 1993 , 363 : 715 ~ 717

Construction of Transgenic Rice Populations by Inserting the Maize Transposon Ac/Ds and Genetic Analysis for Several Mutants

ZHU Zheng-Ge¹ XIAO Han¹ FU Ya-Ping¹ HU Guo-Cheng¹ YU Yong-Hong¹
SI Hua-Min¹ ZHANG Jing-Liu² SUN Zong-Xiu^{1*}

¹(The Key Laboratory for Rice Biology , Ministry of Agriculture , P . R . China National Rice Research Institute , Hangzhou 331006 , China)

²(Shanghai Institute of Plant Physiology , Chinese Academy of Science , Shanghai 200032 , China)

Abstract An efficient and rapid gene transformation system of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was used . Calli induced from immature and mature embryos of Zhonghua No. 11 , a japonic rice variety , were cultured with the *A . tumefaciens* strain EHA105 harboring the superbinary plasmid pDsBar1300 or pUBITs separately , and more than 400 independent transgenic lines inserted Ds element or Ac fragment were obtained . Some visible mutants in T₀ or T₁ generation were found , consisting of disease resistance , albino , dwarf , male sterile , chlorosis , early heading , late heading , stripe , etc . From the phenotype analysis , a few mutants such as dwarf and male sterile seemed to be linked to the Basta resistance and the transposon .

Key words transposon , mutant , PCR , Southern blotting , RAPD

Received : December 8 , 2000

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (39789020) .

* Corresponding author . Tel : 86-571-3370343 ; Fax : 86-571-3370389 ; E-mail : sunzx@mail.hz.zj.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn