

# 拟南芥 *atcwinv1* 基因 T-DNA 插入纯合突变体 PCR 鉴定及表型观察

阮燕晔\*, 张莹, 王波  
(沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866)

**摘要:** 以拟南芥 *atcwinv1* 基因 T-DNA 插入纯合突变体和野生型植株为材料, 比较研究了 2 种基因型植株在营养期和生殖期的形态差异。结果表明: 拟南芥 *atcwinv1* 基因 T-DNA 插入纯合突变体(简称突变体)较野生型萌发率平均下降 5.88 个百分点; 突变体在 44 d 抽薹, 较野生型延后 4 d; 分支数平均 4 支, 较野生型下降 20.84%; 果荚开裂时间 6 d 左右, 较野生型延长 2 d; 单株果荚数平均 62.27 个, 较野生型降低 11.00%; 单株果荚种粒数平均 45.87 粒, 较野生型降低 21.46%; 突变体的单果荚长度平均 14.52 cm, 较野生型降低 10.24%; 单株果质量平均 50.83 mg, 较野生型降低 23.70%。拟南芥突变体在营养生长时期的株高平均 10.44 cm, 较野生型下降 21.03%; 主根长平均 7.62 cm, 较野生型下降 14.96%; 单株莲座叶面积平均 3.16 cm<sup>2</sup>, 较野生型下降 13.90%; 单株地上部分鲜质量平均 81.81 mg, 较野生型下降 11.11%; 单株根鲜质量平均 6.21 mg, 较野生型下降 17.64%; 单株地上部分干质量平均 6.17 mg, 较野生型下降 15.60%; 单株根干质量平均 0.55 mg, 较野生型下降 6.78%。拟南芥突变体在生殖生长时期的株高平均 18.78 cm, 较野生型增加 4.22%; 主根长平均 16.48 cm, 较野生型下降 5.88%; 单株莲座叶面积平均 6.80 cm<sup>2</sup>, 较野生型下降 6.21%; 单株地上部分鲜质量平均 129.85 mg, 较野生型下降 9.69%; 单株根鲜质量平均 9.97 mg, 较野生型下降 13.23%; 单株地上部分干质量平均 9.22 mg, 较野生型下降 4.16%; 单株根干质量平均 0.70 mg, 较野生型下降 6.67%。以上研究结果表明, *atcwinv1* 基因 T-DNA 插入突变影响了拟南芥植株正常的生长发育。

**关键词:** 拟南芥; *atcwinv1* 基因; T-DNA 插入突变; 基因功能

**中图分类号:** Q789      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2011)05-0062-05

## PCR Identification and Phenotypic Observation of *atcwinv1* Gene T-DNA Insertional Mutant of *Arabidopsis*

RUAN Yanyue\*, ZHANG Ying, WANG Bo

(Institute of Biological Science and Technology of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** In the research, homozygous mutant (*atcwinv1*) and wild type of *Arabidopsis* were used to compare plant morphological differences in the period of vegetative growth and reproductive growth. The results showed that compared to the wild type the germination rate of *atcwinv1* averagely decreased by 5.88 percentage points; compared to the wild type, bolting time of *atcwinv1* was 44 d, delayed 4 days; branch number of *atcwinv1* was 4, decreased by 20.84%; cracking time of the pod of *atcwinv1* was 6, delayed 2 days; fruit pod number per plant of *atcwinv1* was 62.27, decreased by 11.00%, fruit number of a pod of *atcwinv1* was 45.87, decreased by 21.46%; length of a fruit pod of *atcwinv1* was 14.52 cm, decreased by 10.24%; fruit weight of a plant of *atcwinv1* was 50.83 mg, decreased by 23.70%. In the period of vegetative growth, compared to

收稿日期: 2011-02-11  
基金项目: 辽宁省教育厅项目资助(20060784)  
作者简介: 阮燕晔(1971-), 男, 安徽贵池人, 副教授, 博士, 主要从事植物分子生物学研究。\* 为通讯作者。  
E-mail: yanyeruan@yahoo.com.cn

the wild type, plant height of *atcwinv1* was 10.44 cm, decreased by 21.03%; root length of *atcwinv1* was 7.62 cm, average decreased by 14.96%; area of rosette leaf of *atcwinv1* was 3.16 cm<sup>2</sup>, decreased by 13.90%; aboveground fresh weight of per plant was 81.81 mg, decreased by 11.11%; fresh weight of root per plant was 6.21 mg, decreased by 17.64%; aboveground dry weight of per plant was 6.17 mg, decreased by 15.60%; dry weight of root per plant was 0.55 mg, decreased by 6.78%; In the period of reproductive growth, compared to the wild type, plant height of *atcwinv1* was 18.78 cm, increased by 4.22%; root length of *atcwinv1* was 16.48 cm, averagely decreased by 5.88%; area of rosette leaf of *atcwinv1* was 6.80 cm<sup>2</sup>, decreased by 6.21%; fresh weight of a plant of *atcwinv1* was 129.85 mg, decreased by 9.69%; fresh weight of root per plant was 9.97 mg, decreased by 13.23%; aboveground dry weight of per plant was 9.22 mg, decreased by 4.16%; dry weight of root per plant was 0.70 mg, decreased by 6.67%. The results obtained showed that growth of *Arabidopsis* was influenced by T-DNA insertional mutagenesis of *atcwinv1* gene.

**Key words:** *Arabidopsis*; *atcwinv1* gene; T-DNA insertional mutagenesis; Gene function

蔗糖是高等植物体内光合产物运输与分配的主要形式,其在植株中定向运输和分配的方式不仅调控植株的整个生长和发育进程,也决定作物的产量和品质。而在蔗糖的库器官卸载过程中,细胞壁转化酶发挥着重要的作用<sup>[1-2]</sup>。目前,对细胞壁转化酶的研究主要集中在其基因克隆和表达方面。细胞壁转化酶基因最先从胡萝卜中分离得到<sup>[3]</sup>,随后在马铃薯、拟南芥、烟草、番茄和葡萄等植物中也分离到编码该酶的全长或部分的核苷酸序列。细胞壁转化酶基因在质体外中表达最活跃,并通过增加蔗糖的浓度梯度加快蔗糖卸载<sup>[4]</sup>。此外,细胞壁转化酶还在蔗糖水解<sup>[4]</sup>、渗透调节<sup>[5]</sup>和伤害胁迫<sup>[3,6]</sup>中起作用。

目前,在模式植物拟南芥中分离出了4个编码细胞壁转化酶的相关基因,分别是 *atcwinv1*, *atcwinv2*, *atcwinv4*, *atcwinv5*, 其中 *atcwinv1* 基因的表达水平最高,被普遍认为是蔗糖在韧皮部卸载的一个主效基因<sup>[7]</sup>,但其确切的生理生化功能和作用机制还不十分清楚。目前,拟南芥基因组测序已经完成,而且有大量的 T-DNA 插入突变体,从中可以获得细胞壁转化酶基因敲出的突变体<sup>[8]</sup>,因而是用反向遗传学方法研究植物细胞壁转化酶基因的最理想的材料。通过比较拟南芥细胞壁转化酶基因纯合突变体与野生型拟南芥生长发育以及生理特征,可以获得拟南芥细胞壁转化酶基因的生理功能的相关信息。鉴此,对拟南芥 *atcwinv1* 基因 T-DNA 插入纯合突变体进行表型观察,揭示该基因缺失对拟南芥植株生长发育的影响,为进一步研究该基因生理功能奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

*atcwinv1* 基因 T-DNA 插入拟南芥种子(编号为 salk\_091455,原种为 Columbia-0 型)由拟南芥生物资源中心提供,拟南芥野生型(Col-0)种子由英国

伯明翰大学提供。

### 1.2 方法

1.2.1 拟南芥培养 拟南芥 *atcwinv1* 型和野生型种子经 4℃ 下春化 3 d 后播种于盆土(泥炭土:蛭石=3:1)。2 种基因型种子分 3 批培养,每批分别播种 100 盆,每盆栽种 1 株拟南芥。将种好的拟南芥置于长日照周期为 10 h 光照/14 h 黑暗、光照强度为 150 μmol/(m<sup>2</sup>·s)、相对湿度为 70% 白天/80% 夜间和温度为 (22±1)℃ 的培养室内生长<sup>[9]</sup>。每批植株生长到 35 d 时(营养期)收获 1 次,每次收获 50 株;55 d 时(生殖期)收获 1 次,每次收获 50 株,收获植株全部用于表型性状观测。

1.2.2 *atcwinv1* 纯合突变体 PCR 鉴定 采用三引物 PCR 法,以所提取的拟南芥植株总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增<sup>[10-11]</sup>。*atcwinv1* 基因引物由宝生物工程(中国)有限公司合成,3 条引物分别为 LP: 5'-TCTTCCCTATATTTGCAAGCG-3'; RP: 5'-TG-GTTTCAAGATGGACGGTAG-3'; LBa1: 5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'。反应体系共 20 μL: 1 μL 模板、1 μL (20 μmol/L) 引物、0.4 μL (10 mmol/L) dNTPs、2 μL (10 × PCR) 缓冲液、3.6 μL (25 mmol/L) MgCl<sub>2</sub>、Taq DNA 聚合酶 1 U (BBI)、双蒸水 1 μL,甘油 10 μL。循环参数(30 次循环): 94℃, 1 min; 58℃, 1 min; 72℃, 2 min。选用 1.7% 的琼脂糖凝胶(内含 0.5 mg/L Goldveiw)电泳检测后,用凝胶成像系统在 300 nm 波长的透射光下照相并记录扩增结果。所用 DNA 分子量标准为 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI, 购自宝生物工程(中国)有限公司)。

### 1.3 *atcwinv1* 纯合突变体表型性状的观测

选取拟南芥 15 个性状进行观测记录。采用统计方法记录拟南芥 *atcwinv1* 纯合突变体和野生型种子的萌发率,植株的抽薹时间、分支数、果荚开裂时间、单株果荚数、单果荚的种粒数;使用电子游标

卡尺测量单果荚长度, 测量植株在营养期和生殖期的株高、主根长; 使用 1/10000 电子分析天平测量单株果质量, 测量单株地上部分和根的鲜质量、干质量(将新鲜样品置于 105℃烘箱中杀青 10 min, 再于 80℃下烘干至恒定质量后可测定样品干质量); 使用 Zeiss LSM 共聚焦显微镜图像浏览软件, 测定单株的莲座叶面积, 取平均值进行分析。突变体相对野生型的增长率/降低率 = (*atcwinl* 平均指标 - Col-0 平均指标)/Col-0 平均指标×100%。

2 结果与分析

2.1 拟南芥 *atcwinl* 基因 T-DNA 插入纯合突变体植株鉴定

如图 1 所示, 泳道 1- 4 为拟南芥 *atcwinl* 基因 T-DNA 插入纯合突变体植株, 其扩增得到的条带与目的基因特异性扩增条带(2957 bp) 位置一致; 泳道 5- 8 为野生型植株, 其扩增得到的条带与目的基因特异性扩增条带(1104 bp) 位置一致。以上结果表明, 本研究所用的拟南芥 *atcwinl* 突变体材料为该基因 T-DNA 插入纯合突变体。

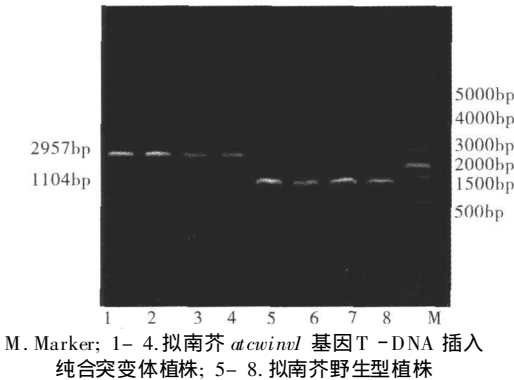


图 1 拟南芥 *atcwinl* 基因的 PCR 分析

表 1 *atcwinl* 基因 T-DNA 插入突变对拟南芥果荚性状的影响

基因型	果荚开裂时间/ d	果荚长度/ cm	单株果荚数/ 个	单果荚种粒数/ 粒	单株果质量/ mg
Col-0	4.03±0.16	16.17±0.14	69.97±0.94	58.40±1.71	66.62±1.58
<i>atcwinl</i>	6.07±0.20	14.52±0.15	62.27±0.92	45.87±1.81	50.83±1.62

2.4 *atcwinl* 基因 T-DNA 插入突变对拟南芥鲜质量、干质量的影响

如图 3 所示, 在营养生长期, 拟南芥 *atcwinl* 基因 T-DNA 插入纯合突变体的单株地上部分鲜质量平均为 81.81 mg, 相对于野生型下降 11.11%; 突变体单株根的鲜质量平均为 6.21 mg, 相对于野生型下降 17.64%。在生殖生长期, 拟南芥 *atcwinl* 基因 T-DNA 插入纯合突变体单株地上部分鲜质量平均为 129.85 mg, 相对于野生型下降 9.69%; 突变体单株根鲜质量平均为 9.97 mg, 相对于野生型下降 13.23%。

2.2 *atcwinl* 基因 T-DNA 插入突变对拟南芥种子萌发率的影响

如图 2 所示, 在拟南芥种子整个萌发周期中, *atcwinl* 基因纯合突变体种子较野生型种子在 24h 的萌发率降低 8.22 个百分点, 在 48h 的萌发率降低 2.13 个百分点, 在 72h 的萌发率降低 7.29 个百分点, 平均下降 5.88 个百分点。以上结果表明, *atcwinl* 基因 T-DNA 插入突变, 拟南芥种子萌发率降低。

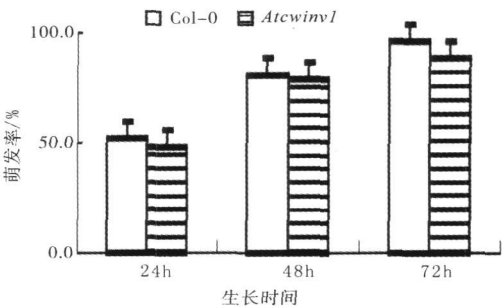


图 2 *atcwinl* 基因 T-DNA 插入突变对拟南芥种子萌发率的影响

2.3 *atcwinl* 基因 T-DNA 插入突变对拟南芥果荚性状的影响

如表 1 所示, 拟南芥 *atcwinl* 基因 T-DNA 插入纯合突变体果荚开裂时间 6 d 左右, 较野生型果荚开裂时间延长 2 d; 突变体的果荚长度平均为 14.52 cm, 较野生型降低 10.24%; 突变体的单株果荚数平均 62.27 个, 较野生型降低 11.00%; 单株果荚种粒数平均 45.87 粒, 较野生型降低 21.46%; 单株果质量平均为 50.83 mg, 较野生型降低 23.70%。以上结果表明, *atcwinl* 基因 T-DNA 插入突变, 拟南芥果荚长势较差, 果粒质量下降。

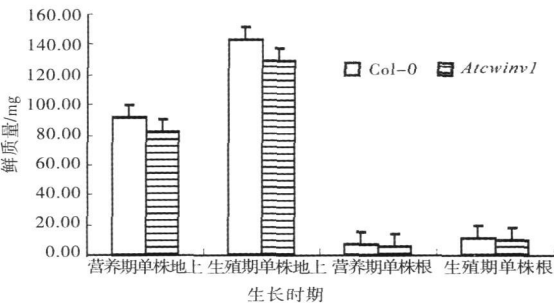


图 3 *atcwinl* 基因 T-DNA 插入突变对拟南芥鲜质量的影响

以上结果表明, *atcw invl* 基因 T - DNA 插入突变, 植株地上部分及根鲜质量下降。

如图 4 所示, 在营养生长期, 拟南芥 *atcw invl* 基因 T - DNA 插入纯合突变体的单株地上部分干质量平均为 6.17 mg, 相对于野生型下降 15.60%; 突变体单株根干质量平均为 0.55 mg, 相对于野生型下降 6.78%。在生殖生长期, 拟南芥 *atcw invl* 基因 T - DNA 插入纯合突变体的单株地上部分干质量平均为 9.22 mg, 相对于野生型下降 4.16%; 拟南芥突变体单

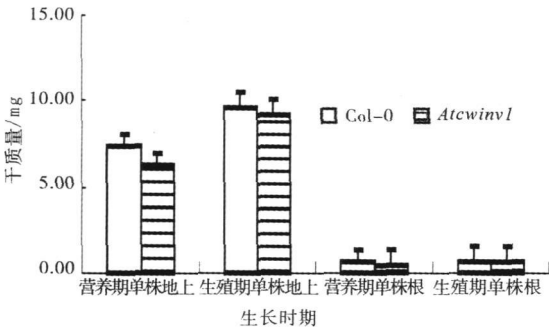


图 4 *atcw invl* 基因 T - DNA 插入突变对拟南芥干质量的影响

株根干质量平均为 0.70 mg, 相对于野生型下降 6.67%。以上结果表明, *atcw invl* 基因 T - DNA 插入突变, 植株地上部分及根干质量下降。

2.5 *atcw invl* 基因 T - DNA 插入突变对拟南芥地上部分、地下部分性状的影响

如表 2 所示, 拟南芥 *atcw invl* 基因纯合突变体在 44 d 时开始抽薹, 相对于野生型植株延后 4 d。拟南芥突变体分支数平均 4 支, 相对于野生型下降 20.84%。拟南芥突变体在营养生长时期的株高平均为 10.44 cm, 相对于野生型下降 21.03%; 主根长平均 7.62 cm, 相对于野生型下降 14.96%; 单株莲座叶面积平均 3.16 cm<sup>2</sup>, 相对于野生型下降 13.90%。拟南芥突变体在生殖生长时期的株高平均 18.78 cm, 相对于野生型增加 4.22%; 主根长平均 16.48 cm, 相对于野生型下降 5.88%; 单株莲座叶面积平均 6.80 cm<sup>2</sup>, 相对于野生型下降 6.21%。以上结果表明, *atcw invl* 基因 T - DNA 插入突变对拟南芥的抽薹时间、分支数、营养生长期和生殖生长期的株高、根长、莲座叶面积都有影响(图 5、图 6)。

表 2 *atcw invl* 基因 T - DNA 插入突变对拟南芥地上、地下部分性状的影响

基因型	抽薹时间/ d	分支数/ 株	株高/ cm		主根长/ cm		单株莲座叶面积/ cm <sup>2</sup>	
			营养期	生殖期	营养期	生殖期	营养期	生殖期
Col-0	40.33±0.21	5.47±0.10	13.22±0.92	18.02±0.08	8.96±0.08	17.51±0.10	3.67±0.02	7.25±0.14
<i>atcw invl</i>	44.10±0.18	4.33±0.15	10.44±0.79	18.78±0.05	7.62±0.11	16.48±0.08	3.16±0.02	6.80±0.11

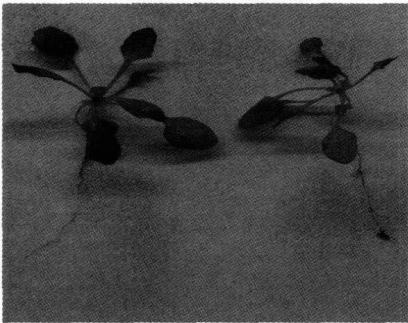


图 5 营养期拟南芥植株表型对比

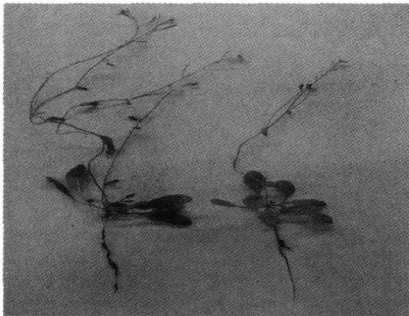


图 6 生殖期拟南芥植株表型对比

3 讨论

定位于高等植物细胞壁上的转化酶是  $\beta$ -呋喃果糖苷酶类的一种。这种细胞壁转化酶不仅可以与单糖转运蛋白协同调控细胞的分裂和生长<sup>[2]</sup>, 而且可以通过在质外体运输过程中形成源和库之间的蔗糖浓度梯度的方式<sup>[12]</sup>, 达到控制韧皮部蔗糖吸收的速度, 调控蔗糖卸载的目的<sup>[2,13]</sup>。

目前研究结果表明, 编码细胞壁转化酶的基因主要是 *atcw inv1*, *atcw inv2*, *atcw inv4*, *atcw inv5*, 其中 *atcw inv1* 基因的表达水平最高, 被普遍认为是蔗糖在韧皮部卸载的一个主效基因<sup>[7]</sup>, 但其确切的生理生化功能和作用机制还不十分清楚。近代分子生物学的研究表明, 植株的生长发育全过程都受控于基因表达, 为了解 *atcw inv1* 基因在高等植物生长发育过程中的功能及其可能的作用机制, 本研究以拟南芥 *atcw invl* 基因 T - DNA 插入纯合突变体和拟南芥野生型植株为材料, 比较观测二者的表型性状。结果表明, 拟南芥纯合突变体植株较野生型植株抽薹时间延后, 分支数、果荚数、单果荚种粒数相

应减少,果荚开裂时间延长,果荚长度较短,单株果质量下降,单株鲜质量、干质量明显降低,除生殖期突变体株高略有升高外,其他时期植株株高、主根长、莲座叶面积均下降。这表明 *atcw inv1* 基因 T-DNA 插入突变影响了拟南芥植株正常的生长发育。Tymowski & Lalanne 等研究拟南芥细胞壁转化酶基因在成熟叶片中的表达情况时发现, *atcw inv1* 基因的表达水平最高,该基因在子叶中不表达,在成熟叶片中高水平表达,在花中不表达<sup>[14]</sup>,被普遍认为是蔗糖在韧皮部卸载的一个主效基因<sup>[7]</sup>。本研究结果也证实了这一点。但是 *atcw inv1* 基因对拟南芥生长发育的影响机制尚不清楚,有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Sturm A, Tang G Q. The sucrose cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning[J]. Trends Plant Sci, 1999, 4: 401-407.
- [2] Weschke W, Panitz R, Gubatz S, et al. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development[J]. Plant, 2003, 33(2): 395-411.
- [3] Sturm A, Chrispeels M J. cDNA cloning of carrot extracellular[ $\beta$ ]-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection[J]. Plant Biologists, 1990, 2: 1107-1119.
- [4] Fromm J, Eschrich N. Correlation of ionic movements with phloem unloading and loading in barley leaves[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1989, 27: 577-585.
- [5] Meyer R F, Boyer J S. Osmoregulation, solute distribution, and growth in soybean seedlings having low water potentials[J]. Planta, 1981, 151: 482-489.
- [6] Matsushita K, Uritani I. Change in invertase activity of sweet potato in response to wounding and purification and properties of its invertases[J]. Plant Physiology, 1974, 54: 60-66.
- [7] Lammens W, Le Roy K, Van Laere A, et al. Crystal structures of *Arabidopsis thaliana* cell wall invertase mutants in complex with sucrose[J]. Mol Biol, 2008, 377: 378-385.
- [8] Parinov S, Sundaresan V. Functional genomics in *Arabidopsis*: large scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project[J]. Biotechnology, 2000, 11: 157-161.
- [9] Rohloff J, Bones A M. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana* putative olfactory compounds in plant communication[J]. Phytochemistry, 2005, 66: 1941-1955.
- [10] 巩振辉, Cecchini E, Milner J J. 以 PCR 鉴定转基因植株的微量 DNA 提取方法[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(1): 45-48.
- [11] 杨双, 阮燕畔, 樊金娟, 等. 一种简易的拟南芥幼苗单株微量 DNA 提取方法[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(1): 99-100.
- [12] Bachelier C, Graham J, Machray G, et al. Integration of an invertase gene to control sucrose metabolism in strawberry cultivars[J]. Acta Horticulturae, 1996, 439: 161-163.
- [13] Wobus U, Weber H. Sugars as signal molecules in plant seed development [J]. Biological Chemistry, 1999, 380: 937-944.
- [14] Tymowski & Lalanne Z, Kreis M. Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family[J]. Planta, 1998, 207(2): 259-265.